

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Sección de Biológicas. inéditas



TESIS DOCTORAL

**Biosíntesis de estrógenos en la placenta humana en
condiciones normales y patológicas : contribución al estudio
bioquímico de la reacción de aromatización**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Herundina del Pilar Ferreiros López

Madrid, 2015

T 618.46

FER

bio



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310045459

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOSINTESIS DE ESTROGENOS EN LA PLACENTA HUMANA EN CONDI
CIONES NORMALES Y PATOLOGICAS. CONTRIBUCION AL ESTUDIO
BIOQUIMICO DE LA REACCION DE AROMATIZACION.

Tesis presentada para optar al grado de Doctor
por HERUNDINA DEL PILAR FERREIROS LOPEZ, Licenci
ada en Ciencias Biológicas.

Setiembre, 1972



R.28.215

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto de Obstetricia y Ginecología de la Universidad Católica de Roma, bajo la dirección del Prof. Dr. E. Menini, a quien deseo expresar mi más cordial agradecimiento por el apoyo y la ayuda incondicionales que me ha prestado.

Mi reconocimiento también al Director del Instituto, Prof. Dr. A. Bompiani.

Asimismo quiero hacer constar mi gratitud a todo el personal del Laboratorio, y especialmente a la Dra. Pilar Vega-Ramos, por sus orientaciones en la iniciación de este trabajo y su eficaz colaboración en la parte experimental.

Mi agradecimiento también al Prof. Dr. A. Fraile que ha tenido la bondad de apadrinar la Tesis y al Prof. Dr. A. M. Municio por su ayuda y consejo a lo largo de la realización de este trabajo.

S U M A R I O

INTRODUCCION	VIII
ABREVIATURAS	XI
1. LA PLACENTA HUMANA	
1.1. Aspectos morfológicos y de desarrollo	1
1.1.1 Primeros jalones hacia la formación de la placenta: implantación del huevo	1
1.1.2 Placentación: formación y evolución de las vellosidades coriónicas	3
1.1.3 Placenta desarrollada: definición y aspecto externo	7
1.2 Organo de intercambio entre la madre y el feto	11
1.2.1 Transporte de O_2 y CO_2 : simple difusión	12
1.2.2 Agua y electrolitos: transporte activo	13
1.3 Organo metabólicamente activo	18
1.3.1 Capacidad enzimática de la placenta	21
1.3.3.1 Conversión de glucosa en fructosa	22

1.3.1.1.1	a través de compuestos fosforilados	22
1.3.1.1.2	a través de sorbitol	23
1.3.1.2	La placenta reguladora del metabolismo fetal	26
1.3.1.3	Otras actividades enzimáticas	27
1.4	Glándula endocrina	28
1.4.1	Hormonas proteicas:	31
1.4.1.1	Gonadotropina coriónica	32
1.4.1.2	Lactógeno placentario	34
1.4.2	Hormonas esteroides. Unidad feto-placentaria	37
1.4.2.1	Biosíntesis de la progesterona	38
1.4.2.2	Biosíntesis de andrógenos y corticosteroides	46
1.4.2.3	Biosíntesis de los estrógenos	49
1.5	Reacción de aromatización en relación con la biosíntesis de los estrógenos	61
1.5.1	Vías metabólicas que conducen a la formación de anillos aromáticos en el reino vegetal y en los microorganismos	62
1.5.2	Reacción de aromatización en animales superiores: biosíntesis de hormonas esteroides	64
1.5.3	Mecanismo de aromatización en el paso de andrógenos a estrógenos	66
1.5.3.1	Pérdida del metilo angular en posición 10	69

1.5.3.2	Pérdida de dos átomos de <u>hi</u> drógeno en el anillo A	71
1.5.3.3	Enolización del grupo cetó- nico en 3	74
2.	PLAN DE TRABAJO	78
3.	MATERIALES Y METODOS	
3.1	Productos	81
3.2	Reactivos y disolventes: purificación	85
3.3	Técnicas de purificación de los 16 α -OH-es- teroides	87
3.3.1	Cromatografía sobre capa fina	88
3.3.2	Cromatografía en columna	92
3.3.2.1	columna de alúmina	92
3.3.2.2	columna de ácido silícico + celita	95
3.4	Determinación de los 16 α -OH-esteroides me- diante cromatografía gas-líquido	98
3.4.1	Preparación de las columnas	99
3.4.1.1	Silanización	99
3.4.1.2	Distribución de la fase es- tacionaria sobre el mate- rial de soporte	99
3.4.1.3	Relleno de la columna y precalentamiento	100
3.4.2	Formación de derivados	101
3.4.2.1	Preparación de acetatos	102
3.4.2.2	Preparación de TMSi	103

3.4.3	Técnicas de inyección	103
3.4.4	Valoración de resultados	106
3.4.5	Análisis de esteroides-patrón en distintos tipos de columna	107
3.5	Preparación de tejido placentario	110
3.6	Incubación de sustratos esteroides con <u>te</u> jido placentario	114
3.7	Determinación de los esteroides formados en la incubación	117
3.7.1	Determinación de estrógenos	117
3.7.1.1	Separación fenólica	117
3.7.1.2	Metilación	118
3.7.1.3	Cromatografía de adsorción en columna de alúmina	118
3.7.1.4	Reacción de Kober	120
3.7.2	Determinación de los 16 α -OH-esteroides	123
3.7.3.	Otros estudios cualitativos	124
3.7.3.1	Desaparición del sustrato	125
3.7.3.2	Exámen del residuo de la <u>ex</u> tracción con éter:cloro- formo (3:1)	125
3.8	Determinación de la actividad sulfatásica en la placenta	127
3.9	Determinación de esteroides urinarios y plasmáticos durante el embarazo	129
3.9.1	Determinación de estriol urinario	129
3.9.2	Determinación del pregnandiol urinario	132

3.9.2.1	Hidrólisis de la orina	132
3.9.2.2	Separación fenólica	133
3.9.2.3	Acetilación y purificación	133
3.9.2.4	Cromatografía gas-líquido	135
3.9.3	Determinación de los 17-ceto-esteroides urinarios	136
3.9.4	Determinación de dehidroepiandrosterona sulfato y 16-OH-dehidroepiandrosterona sulfato en orina y plasma	137

4. RESULTADOS

4.1	Condiciones óptimas para la reacción de aromatización en la placenta	140
4.1.1	Estudio de la reacción de aromatización en función de la cantidad de sustrato incubado	141
4.1.1.1	Material utilizado	141
4.1.1.2	Incubación con dehidro-epiandrosterona y 16 α -OH-dehidroepiandrosterona	142
4.1.1.3	Desaparición de dehidro-epiandrosterona y 16 α -OH-dehidroepiandrosterona	143
4.1.1.4	Exámen del residuo de la extracción éter-cloroformo (3:1)	147
4.1.1.5	Determinación de los estrógenos formados en la incubación	147
4.1.2	Estudio de la reacción de aromatización en función del tiempo de incubación	150
4.1.2.1	Material utilizado	

4.1.2.2	Cinética de la incubación con dehidro-epiandrosterona y 16α -OH-dehidroepiandrosterona	151
4.1.2.3	Determinación de los estrógenos	153
4.1.3	Interpretación de los resultados	159
4.2	Estudio de la actividad enzimática de la placenta en relación con la producción de estrógenos	162
4.2.1	Aromatización en un grupo de placetas normales	163
4.2.1.1	Material utilizado	163
4.2.1.2	Valores medios obtenidos	164
4.2.2	Interpretación de los resultados	169
4.2.3	Cinética de la transformación de los 16α -OH-esteroides	170
4.2.3.1	Material utilizado	171
4.2.3.2	Conversión de 16α -OH-Testosterona y 16α -OH-Androstendiona en estriol	171
4.2.3.3	Conversión de 16α -OH-dehidroepiandrosterona en estriol	173
4.2.3.4	Identificación de un 16α -19-dihidroxiandrost-4-ene-3,17-diona, precursor de estriol	174
4.2.4	Interpretación de los resultados	178
4.2.5	Aromatización en casos de insuficiencia placentaria	180
4.2.5.1	Material utilizado	180

4.2.5.2	Valores obtenidos y relación con los valores de placentas normales	180
4.2.6	Interpretación de los resultados	183
4.2.7	Relación entre la actividad aromatizante y la actividad sulfatásica en los casos de insuficiencia placentaria	184
4.2.7.1	Material utilizado	185
4.2.7.2	Valores obtenidos	186
4.2.8	Interpretación de los resultados	192
4.2.9	Aromatización en casos de placentas patológicas	194
4.2.9.1	Material utilizado	194
4.2.9.2	Valores obtenidos	195
4.2.10	Interpretación de los resultados	197
5.	CONCLUSIONES	199
BIBLIOGRAFIA		
	Bibliografía por orden de referencia	204
	Indice alfabético de autores	222

I N T R O D U C C I O N

En estos últimos años la O.M.S. (Organización Mundial de Sanidad) se está ocupando con creciente interés del problema de la mortalidad perinatal. Se considera como periodo perinatal el comprendido entre la semana 28ª de la gestación y el día 7º de la vida extrauterina.

Las estadísticas muestran que el índice de mortalidad en esta etapa de la vida es muy elevado. En las naciones europeas va desde un 18'4 ‰ en Suecia, a un 39'6 ‰ en Portugal. De aquí que se considere como uno de los problemas más serios y urgentes entre los que tiene planteados la medicina de nuestros días.

En algunos países del mundo se está estudiando, como respuesta inmediata, la creación de centros de especialización perinatal, dedicados a mejorar las condiciones asistenciales en este periodo de la vida, pues se ha comprobado que los índices son menores en los países más desarrollados y que prestan una adecuada atención sanitaria en este sentido.

Pero al mismo tiempo es necesario plantear la

solución del problema a niveles más radicales. Una de las causas de la elevada mortalidad prenatal puede ser, entre otras, la existencia de defectos metabólicos en la placenta, que implicando una alteración en el funcionamiento regular de la unidad-feto-placentaria-, comprometen gravemente el desarrollo normal del feto.

Hoy sabemos, por ejemplo, que el estriol que se detecta en la orina de la mujer embarazada y con origen en la unidad feto-placentaria, refleja con extraordinaria exactitud el estado funcional de la placenta y el grado de desarrollo del feto.

Igualmente sabemos que situaciones de insuficiencia placentaria o de "stress" fetal, van con frecuencia acompañados de valores del estriol urinario que caen por debajo de los valores normales y la muerte intrauterina del feto lleva siempre a valores que disminuyen progresivamente hasta alcanzar concentraciones semejantes a las que se dan en la mujer no embarazada.

De aquí que nos haya parecido de suma importancia el profundizar en el estudio bioquímico de la placenta tratando de establecer parámetros hormonales que permitan una interpretación bioquímica de los embarazos patológicos.

Un recorrido detenido a través de la bibliografía referente al enfoque bioquímico de estos problemas (parte primera de la Tesis) nos sugirió el plan de trabajo (parte segunda) propuesto para continuar esta línea de in-

vestigación que nos parecía de gran interés. En la parte tercera se exponen los métodos y material utilizados para la realización de este programa. Y la cuarta, recoge los resultados y conclusiones de nuestras experiencias.

A B R E V I A T U R A S

$\Delta^5 A_2$	(Δ^5)	androstendiol
$19\Delta^5 A_2$	($19\Delta^5$)	19-hidroxi-androstendiol
$\Delta^5 A_2 S$	($\Delta^5 S$)	androstendiol-sulfato
$\Delta^4 A$	(A)	androstendiona
$16\alpha\text{-OH-A}$	($16\alpha A$)	16α -hidroxi-androstendiona
19-OH-A	($19 A$)	19-hidroxi-androstendiona
$\Delta^5 A_3$		androstentriol
Col.		colesterol
DHA	(D)	dehidroepiandrosterona
DHAS	(DS)	dehidroepiandrosterona-sul fato
$16\alpha\text{-OH-DHA}$	($16 DHA$) ($16 D$)	16α -hidroxi-dehidroepiandros terona
$16\alpha\text{-OH-DHAS}$	($16 DHAS$) ($16 DS$)	16α -hidroxi-dehidroepiandros terona-sulfato
19-OH-DHA	($19 DHA$) ($19 D$)	19-hidroxi-dehidroepiandros terona
E_2		estradiol
E_3		estriol

E_1		estrone
P		pregnandiol
Δ^5 PS		pregnandiol-sulfato
T		testosterone
16 α -OH-T	(16 T)	16 α -hidroxi-testosterone
19-OH-T	(19 T)	19-hidroxi-testosterone
TMSi		trimetilsililéteres
KS		ceto-esteroides

1. LA PLACENTA HUMANA

1.1 ASPECTOS MORFOLOGICOS Y DE DESARROLLO

Según el concepto ya tradicional de Mossman, 1937 (1), se puede decir que la formación de la placenta consiste en una aposición íntima de los órganos fetales con los tejidos maternos, con el fin de facilitar los intercambios fisiológicos que han de tener lugar entre la madre y el embrión en desarrollo.

El estudio de las fases principales del desarrollo de la placenta, desde la implantación del huevo hasta su estructura adulta, nos hace comprender más fácilmente la misión que este órgano asume en el desarrollo de un nuevo ser.

1.1.1 Primeros jalones hacia la formación de la placenta: implantación del huevo

Puesto que en la especie humana el óvulo carece de reservas de vitelo, el embrión necesita un medio que le proporcione el alimento necesario para su crecimiento y desarrollo. Después de realizada la fecundación en el oviducto y de haber sufrido las primeras divisiones celulares, el blasto

cisto -embrión al estado de 8 ó 16 células- se encamina hacia el útero para fijarse allí. Durante esta primera fase depende exclusivamente para su alimentación de la secreción de las glándulas uterinas.

Un segundo momento importante metabólicamente para el desarrollo del embrión es el de la implantación. Hacia el sexto o séptimo día después de la fecundación -día 20 ó 21 de un ciclo menstrual de 28 días y en el que la ovulación tiene lugar en el día 14- el blastocisto toma contacto con el epitelio uterino y empieza a implantarse. (Fig.1)

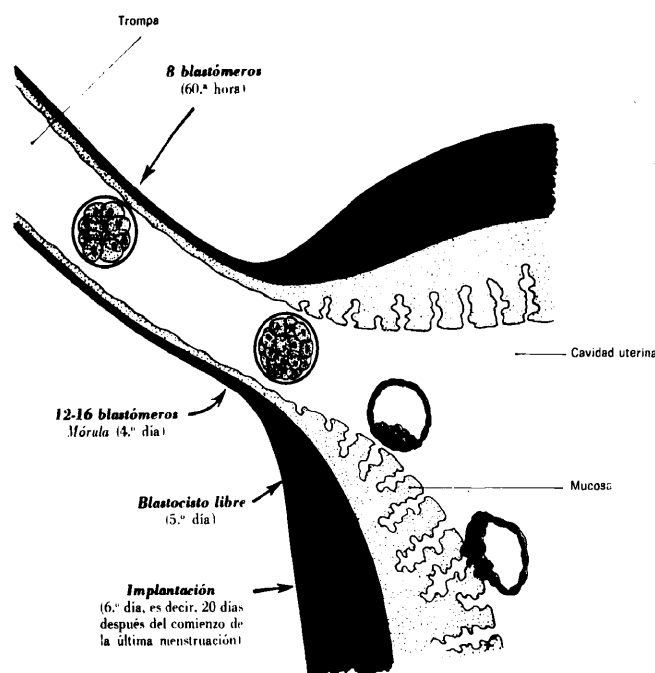


Fig.1 Implantación del huevo.
Según Tuchmann-Duplessis

Este hecho coincide con la fase secretoria del útero. La mucosa uterina está engrosada, ricamente vasculari-

zada y provista de una gran cantidad de glucógeno. Así el blastocisto encuentra condiciones particularmente favorables para la implantación.

En la especie humana la implantación es intersticial. El blastocisto atraviesa el epitelio uterino, llegando a separarse por completo de la luz del útero. Hacia el día 12 ó 13 queda obturado por completo el punto de penetración.

La implantación supone el primer paso hacia la formación de las membranas embrionarias que pondrán en contacto el embrión en desarrollo con el sistema circulatorio materno, pasando de una nutrición embriotrófica a una nutrición hemotrófica.

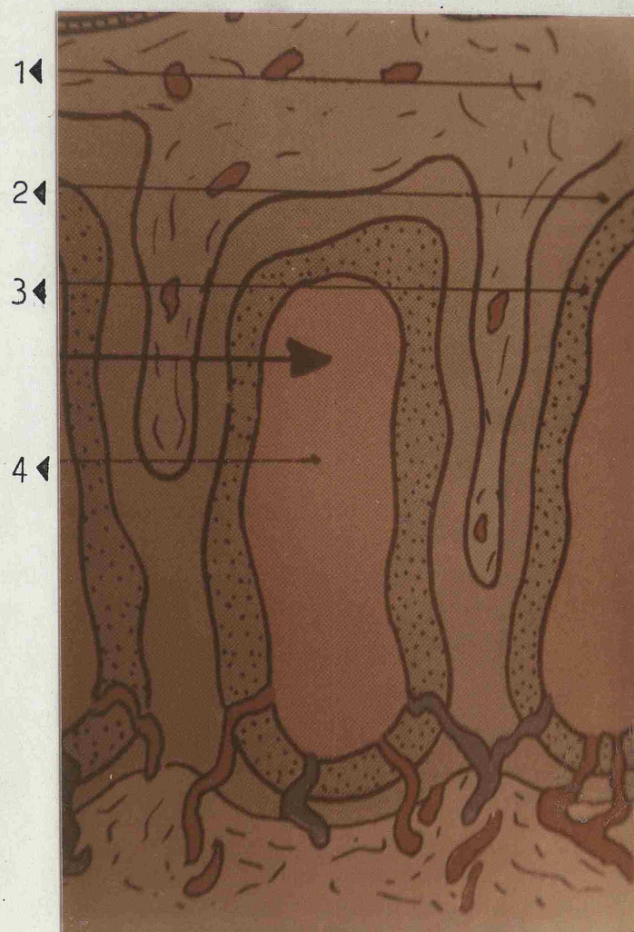
1.1.2 Placentación: formación y evolución de las vellosidades coriónicas

La placentación es un proceso intrincado que se realiza contemporáneamente a la evolución morfogénica del embrión.

Hacia el día noveno, cuando ya está formado el sincitio trofoblástico a partir del citotrofoblasto original, aparecen en su seno lagunas y algunos glóbulos rojos maternos provenientes de los capilares y senos venosos ya degradados. El sincitio trofoblástico va invadiendo los tejidos maternos por medio de la emisión de abundantes prolife-

raciones pseudopodiales, que son las primeras trazas de la aparición de las vellosidades. Continúa proliferando rápidamente hacia el polo embrional del huevo, destruyendo las paredes de los capilares y de los senos venosos de la madre, al mismo tiempo que absorbe la caduca y la sangre que encuentra extravasada.

Hacia el día 14, el sincitio trofoblástico, se dispone en travículas radiales bien formadas, que se diri-



1. Mesénquima
2. Citotrofoblasto
3. Sincitio trofoblástico
4. Espacio intervelloso

gen desde la perife-
ria del huevo, hacia
los tejidos meternos.
(Fig. 2). Las lagu-
nas trofoblásticas
que separan estas tra-
vículas, confluyen
progresivamente, para
formar un espacio con

Fig. 2 Evolución de las vellosidades coriónicas.
Según Tuchmann-Duplessis

tinuo, que dará lugar más tarde a la cámara intervellosa. Aparece así un primer esbozo de la circulación materna de la placenta.

En el interior de cada columna sincitial se encuentra ya iniciado un eje citotrofoblástico. Así hacia el día 18 encontramos que la vellosidad corial está formada por un eje mesenquimático rodeado de un estrato doble de citotrofoblasto y sincitio trofoblástico.

En el seno del mesénquima aparecen islas sanguíneas que son el esbozo de la futura circulación fetal.

Al mismo tiempo, las lagunas han constituido verdaderos espacios intervellosos en los que se lleva a cabo una intensa circulación materna.

Hacia el día 21, la red vascular de las vellosidades se pone en comunicación con los vasos alantoideos, quedando así establecida totalmente la circulación fetal de la placenta. (Fig.3)

Esto nos permite definir la placenta humana como corion-alantoidea. Las vellosidades están directamente en contacto con la sangre materna y están recorridas por vasos originados en la circulación feto-alantoidea.

A partir del segundo mes las vellosidades se ramifican. Algunas de las ramificaciones llega a la cara materna -vellosidades adherentes-; las otras, quedan libres en el espacio intervelloso -vellosidades libres o fluctuantes-. (Fig.4)

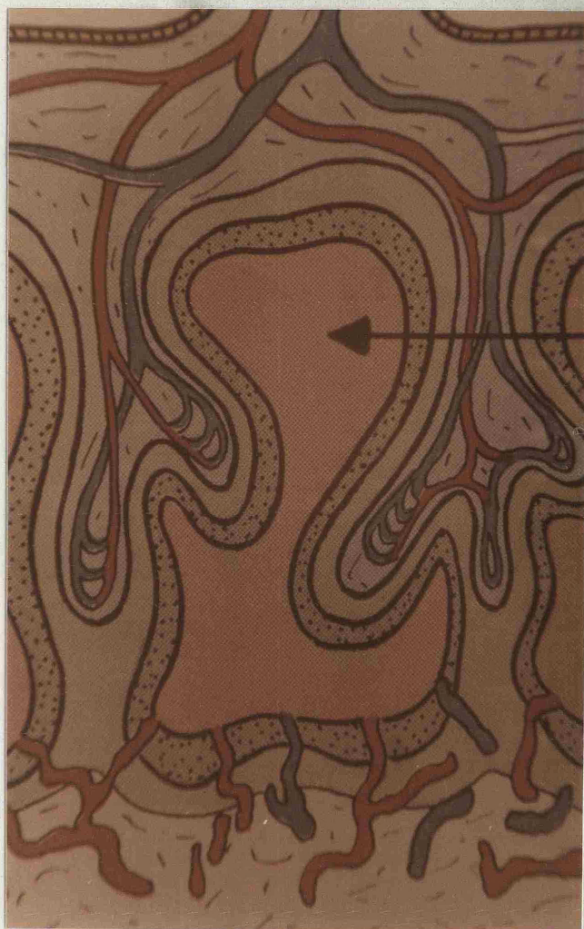
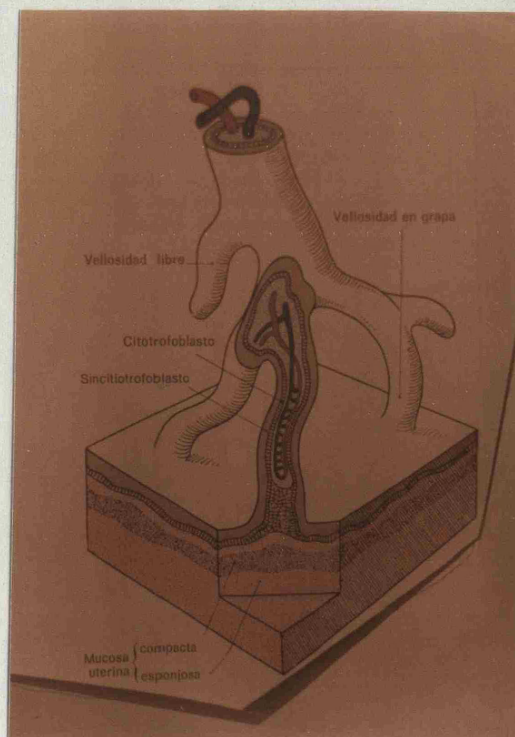


Fig. 3 Circulación materna y fetal en la placenta

Según Tuchmann-Duplessis

Fig. 4 Vellosidad corial del 2º al 4º mes.

Según Tuchmann-Duplessis



1.1.3 Placenta desarrollada: definición y aspecto externo

Al final del tercer mes puede decirse ya que la placenta ha adquirido su aspecto maduro, pudiendo ser definida como hemocorial, corion-alantoidea y vellosa.

En el huevo humano de tres meses pueden verse las vellosidades reagrupadas en uno de sus polos. El resto del involucro está constituido por el "corion laeve", a través del cual se puede entrever el feto.

A partir del tercer mes la placenta queda, pues, claramente delimitada. La abundancia de las vellosidades ofrece una extensa superficie placentaria -al final del embarazo superará los 10 m²-. Es un factor muy importante para la eficacia de los intercambios feto-maternos.

Las vellosidades adherentes que derivan del tronco primario, se insertan sobre la decidua basal delimitando un área más o menos circular. Esta arborización constituye el cotiledón que es la unidad anatómica de la placenta.(Fig.5)

Las células trofoblásticas que han ido aumentando a medida que la placenta crecía, alcanzan un máximo en su crecimiento hacia los 60 días, luego comienzan a declinar. De modo que después del cuarto mes de embarazo han desaparecido casi completamente.

En la segunda mitad del embarazo, la placenta se espesa y se extiende siguiendo el desarrollo del útero. Este crecimiento se lleva a cabo por el notable incremento

de los sistemas capilares. (Fig.6)

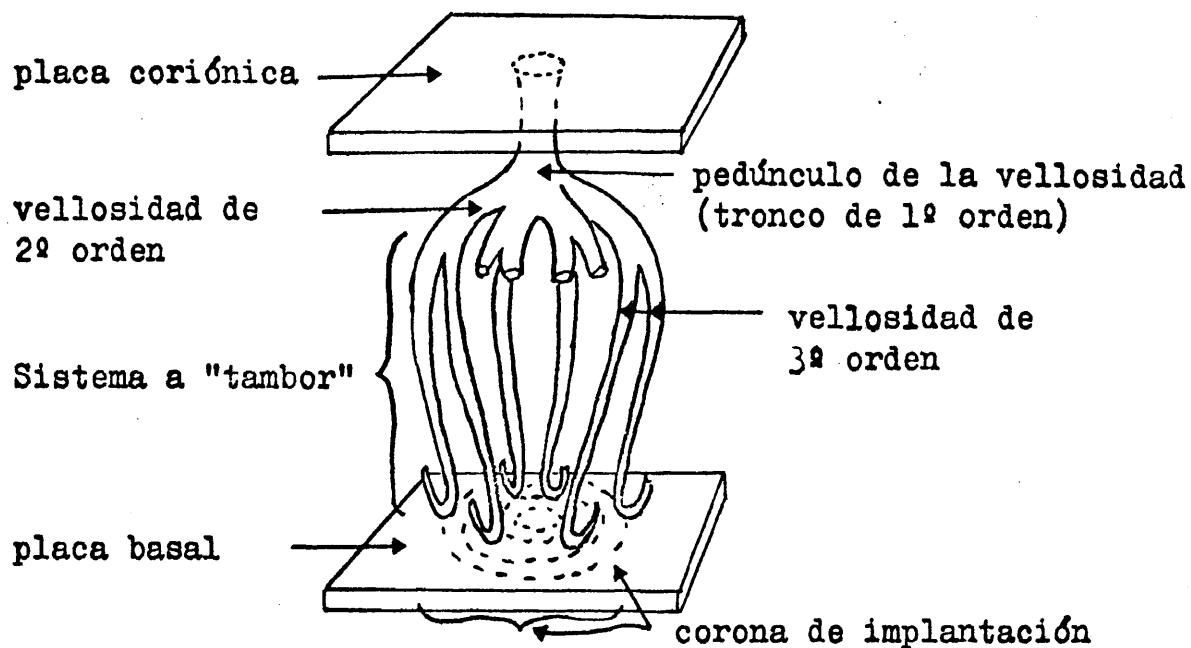


Fig.5 Representación de un cotiledón con sus vellosidades.
Según Wilkins

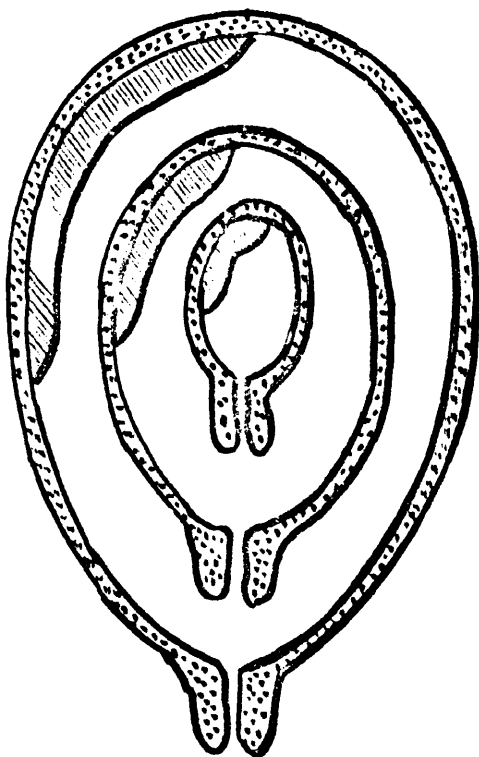


Fig.6 Relación entre el volumen de la placenta y el volumen del útero a los 76, 163 y 261 días de la gestación.

Según Stieve

La placenta, al final del embarazo, es un disco casi circular, muy adelgazado en sus bordes, oscilando entre 15-20 cm de diámetro, con un espesor muy variable -alrededor de 3 cm- y de un peso alrededor de 500 gr, aproximadamente un sexto del peso fetal; aunque también en esto caben variaciones.

Una modificación de esta relación demasiado grande de -peso inferior a 300 gr por ejemplo- es indicio de un paro en la maduración morfológica y funcional, conduciendo a un desarrollo inadecuado del niño. Sin embargo, un órgano normalmente desarrollado puede pesar hasta 1.000 gr.

En la placenta normal, al final del embarazo puede apreciarse una parte de origen fetal (corion). (Fig.7)

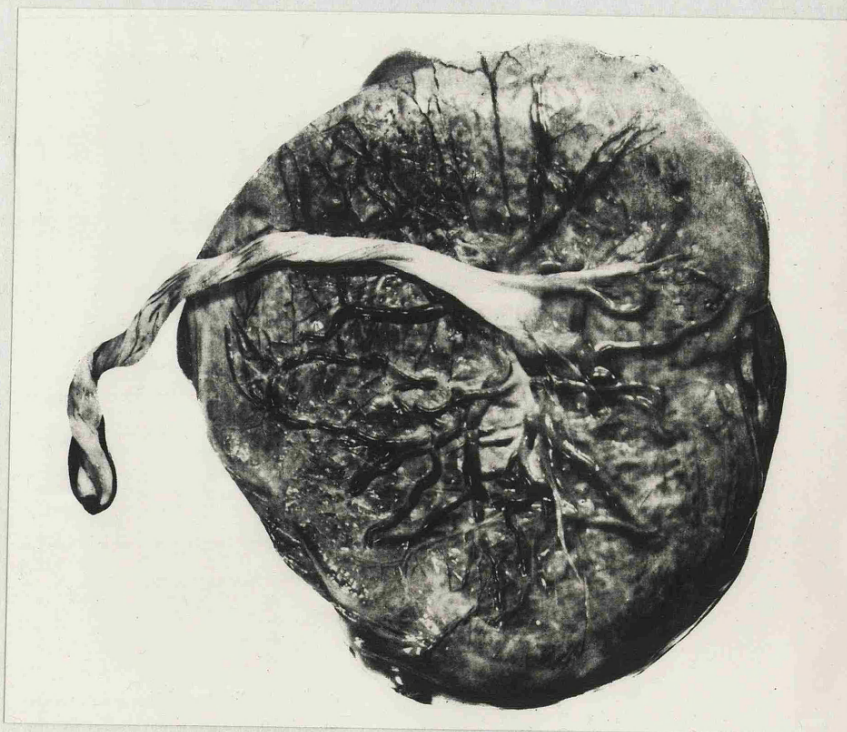


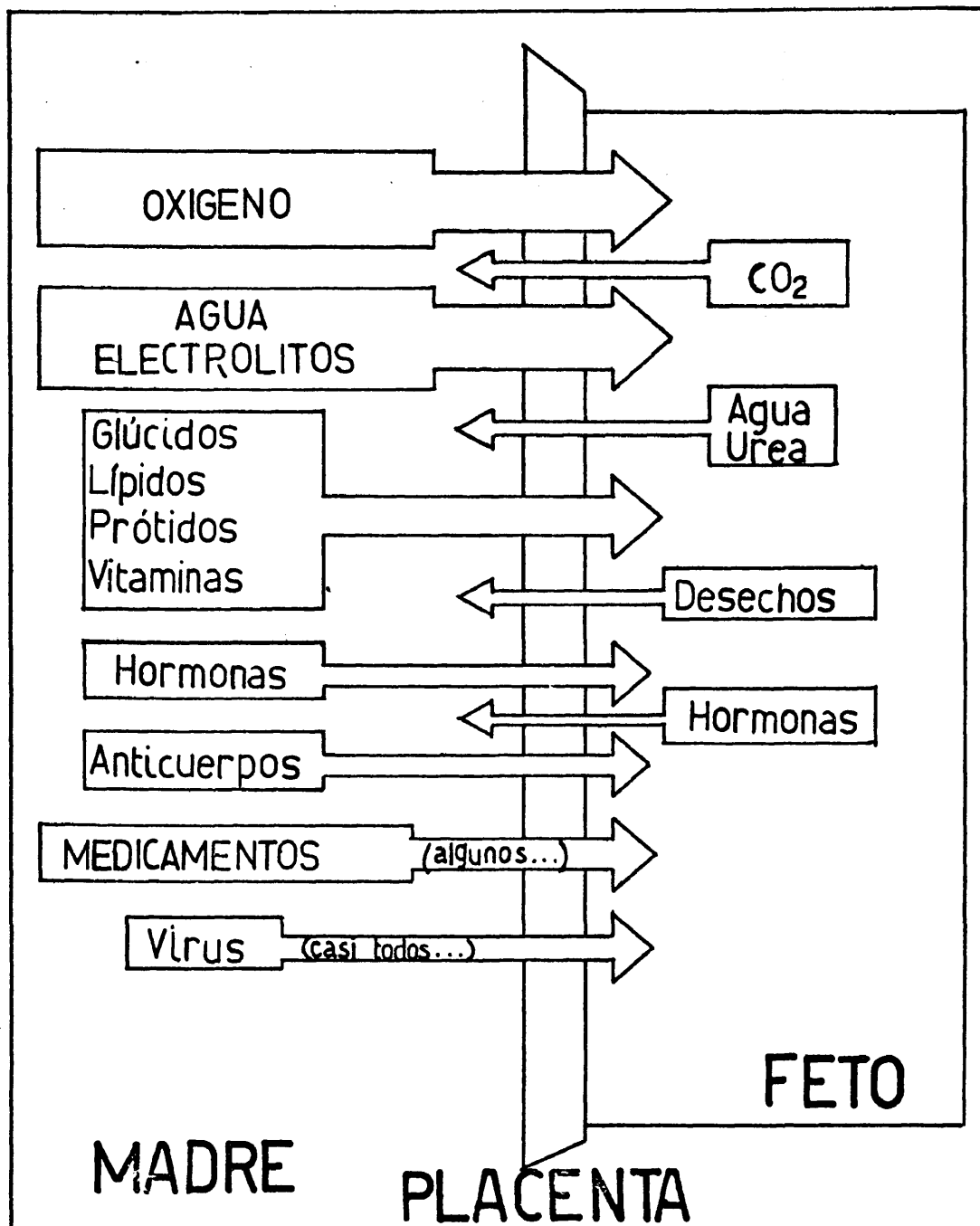
Fig.7 Cara fetal de la placenta en el 9º mes.
Según Tuchmann-Duplessis

y una parte materna, resultado de la transformación de la mucosa uterina (decidua basal). (Fig.8)



Fig.8 Cara materna de la placenta en el 9º mes.
Según Tuchmann-Duplessis

1.2 ORGANO DE INTERCAMBIO ENTRE LA MADRE Y EL FETO



Esquema A

Intercambios entre la madre y el feto a través de la placenta. Según Tuchmann-Duplessis

No todos están de acuerdo en el modo como pasan los nutrientes y los catabolitos de un lado a otro de la barrera placentaria. No cabe duda de que algunos pasan por filtración, siguiendo las leyes de la ósmosis, lo cual requiere un gradiente de concentraciones. Pero el paso de la mayoría de las sustancias no puede explicarse de manera tan sencilla y hay que pensar entonces en un transporte activado.

Ya Page, 1957 (2) clasificó las sustancias que cruzan la membrana en cuatro grupos, según su significado fisiológico:

1) Sustancias esenciales para la vida (Oxígeno, agua) que son transferidas rápidamente por simple difusión.

2) Sustancias importantes para la nutrición del feto (glucosa, aminoácidos, lípidos y vitaminas); el transporte de estas puede tener pasos activados.

3) Sustancias que regulan la actividad metabólica, incluyendo ciertas hormonas. Estas parece que pasan a través de la barrera por difusión lenta.

4) Macromoléculas de importancia inmunológica.

1.2.1 Transporte de O_2 y CO_2 : simple difusión

Algunas sustancias atraviesan con suma facilidad la placenta en virtud de las simples leyes de difusión.

Pero hoy sabemos que esta difusión por puros principios físicos tiene lugar solamente con el oxígeno y en menor grado con el anhídrido carbónico y con algunas drogas y gases anestésicos, Hellegers, 1964 (3); Metcalfe, 1965 (4) y Adamsons, 1965 (5).

La cantidad de oxígeno transportado depende de varios factores: diferencia entre la presión de oxígeno de la sangre fetal y la de la madre, entre el flujo sanguíneo materno en la cámara intervellosa y el flujo fetal en los capilares coriónicos, y del grosor y superficie efectiva de la barrera placentaria.

La evolución de la estructura placentaria, desde el principio hasta el final de la gestación, tiene una enorme importancia para explicar sus funciones.

1.2.2 Agua y electrolitos: transporte activo

Como hemos dicho, casi todos los nutrientes y los catabolitos del metabolismo fetal, atraviesan la placenta en virtud de un paso activado. Lo demuestra el hecho de que muchas sustancias se encuentran en mayor concentración en la sangre fetal que en la sangre de la madre, por ejemplo el sodio, Miller, 1941 (6); fosfatos inorgánicos, Fuchs, 1957 (7), Fuchs y Fuchs, 1957 a y b (8); calcio, D'Agostino Barbaro, 1952 (9) y Hallmann, 1953 (10); hierro, Widmer, 1948 (11)

y aminoácidos, Clemetson y Churchman, 1954 (12), Setnikar, 1957 (13), Villee, 1960 (14) y Dancis, 1952 (15).

Schreiner, 1965 (16) ha demostrado que la mayor concentración de estos elementos en la circulación fetal debe constituir una ventaja para el feto. Pero estas sustancias deben ser transportadas en contra del gradiente de concentración y, por lo tanto, requieren un transporte activo.

Desde 1948 sabemos por los estudios de Flexner y Pohl, 1941 a y b (17); Plentl, 1959 (18) y Stenberg, 1962 (19), que el paso del agua al feto tiene lugar de un modo mucho más rápido de lo que se podría esperar por simple difusión. Calculando la cantidad de agua transferida al feto en una hora, se obtuvieron los siguientes resultados:

101 ml/h	- semana 14ª
3.500 ml/h	- semana 33ª (valor máximo)
1.580 ml/h	- semana 40ª

También se encontró un máximo entre las semanas 31 y 33 del embarazo en los valores que se referían a la cantidad de agua transferida por gramo de placenta en una hora. Los valores se hacían cinco veces mayores de la semana 14ª al final. (Fig. 9a) (Fig. 9b)

Parece ser que este paso de agua tiene lugar mediante una verdadera succión de la sangre fetal; y por otra parte, parece que también juegue un papel importante el líquido amniótico que aparece relleno la cavidad amniótica desde la tercera semana. En la décima semana llega a tener un volumen de 30 ml; en la semana veinte alcanza los 350 ml

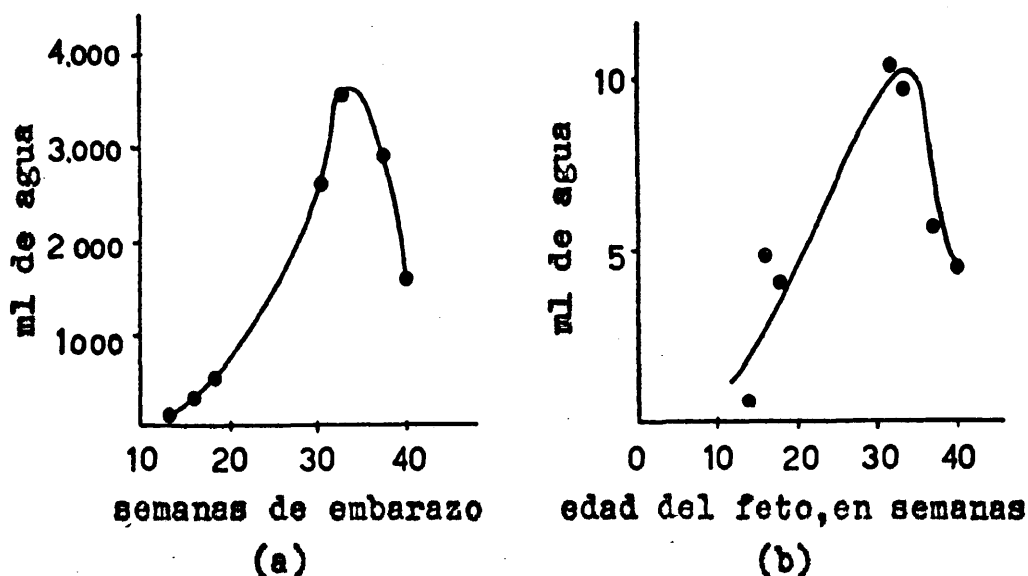


Fig. 9a. Cantidad de agua transferida al feto humano en una hora.

Fig. 9b. Cantidad de agua transferida al feto humano por gramo de placenta en una hora.

Según Hellman y Col.

y en la semana treinta y ocho aproximadamente un litro. A partir de esta fecha, las cifras comienzan a decrecer: 800 ml en la semana cuarenta y menos todavía en los embarazos prolongados.

En cuanto al origen de este líquido, sólo se sabe que procede en parte del feto y, en parte, de la madre, y que existe una constante renovación que es particularmente importante para el agua. Se ha visto que existe una corriente desde la madre al líquido amniótico y de aquí al feto: de 3 a 4 litros por hora, Hutchison y col., 1959 (20) y Scoggin y col., 1964 (21). Si no existiera una contracorriente de igual intensidad el líquido amniótico iría aumentando, provocando un

5310045-459

hidramnios y después, el estallido de las membranas amnióticas. Efectivamente esta eliminación de agua desde el feto al líquido amniótico ha sido también demostrada, aunque el mecanismo de formación y renovación del líquido amniótico sigue siendo todavía desconocido.

En lo que se refiere a electrolitos, se ve claramente que la intensidad de los intercambios es inversamente proporcional al grosor de la membrana placentaria, grosor que varía de unas especies animales a otras, y que aumenta regularmente durante el curso de la gestación. En la mayoría de los tipos placentarios pasa por un máximo poco tiempo antes del término normal. (Fig. 10)

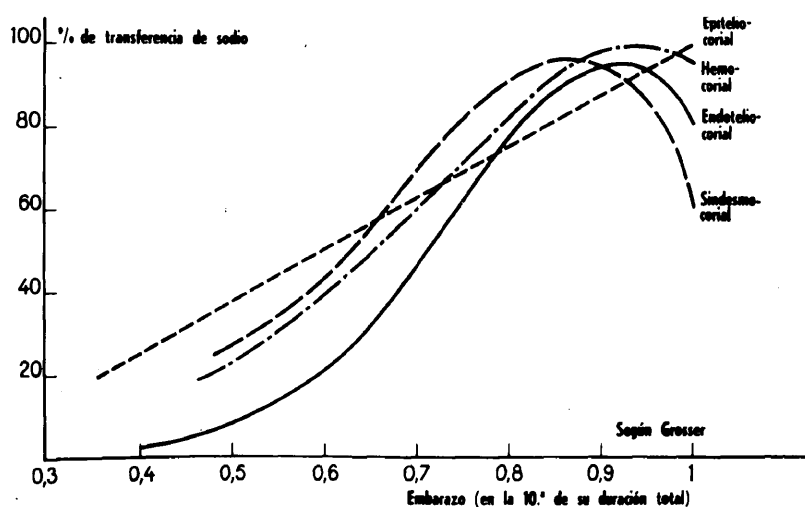


Fig. 10 Transporte de sodio en los distintos tipos de placenta.
Según Tuchmann-Duplessis

Como puede verse en la gráfica de la figura 10, el descenso al final de la gestación puede ser atribuido, en la placenta hemocorial, al depósito de una capa de fibrina sobre la superficie de cambio. La gráfica muestra los cambios que experimenta el transporte de sodio a lo largo de la gestación en los distintos tipos de placentas.

1.3 ORGANO METABOLICAMENTE ACTIVO

TABLA I Enzimas encontradas en la placenta

Número	Nombre
1.1.1.8	Glicerolfosfato dehidrogenasa
1.1.1.27	Lactato dehidrogenasa
1.1.1.37	Malato dehidrogenasa
1.1.1.42	Isocitrato dehidrogenasa
1.1.1.49	Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa
1.1.1.51	β -hidroxi-esteroide-dehidrogenasa ($3\beta, 11\beta, 17\beta$)
1.1.1.-	α -hidroxi-esteroide-dehidrogenasa (20α)
1.1.1.-	Propanodiol dehidrogenasa
1.1.1.-	Sorbitol dehidrogenasa
1.3.99.1	Succinato dehidrogenasa
1.4.1.3	Glutamato dehidrogenasa
1.4.3.4	Monoamina oxidasa
1.4.3.6	Diamina oxidasa
1.6.1.1	NAD (P) transhidrogenasa
1.6.99.-	NADH ₂ diaforasa
1.6.99.-	NADPH ₂ diaforasa
1.9.3.1	Citocromo oxidasa

1.11.1.6	Catalasa
1.99.1.9	Esteroides-17 α -hidroxilasa
1.99.1.-	Esteroides-16 α -hidroxilasa ?
2.1.1.-	Histamina metiltransferasa
2.3.1.6	Colina acetiltransferasa
2.6.1.1	Aspartato aminotransferasa (glutámico-oxalacético-transaminasa)
2.6.1.2	Alanina aminotransferasa (glutámico-pirúvico-transaminasa)
2.7.1.2	Glucoquinasa
2.7.1.11	Fosfofructoquinasa
2.7.4.3	Adelinato quinasa
2.7.7.16	Ribonucleasa
2.8.2.1	Aril sulfotransferasa
2.8.3.3	Malonato CoA-transferasa
3.1.1.3	Lipasa
3.1.1.6	Acetilesterasa
3.1.1.8	Colinesterasa
3.1.3.1	Fosfatasa alcalina
3.1.3.2	Fosfatasa ácida
3.1.3.5	5'-Nucleotidasa
3.1.3.9	Glucosa-6-fosfatasa
3.1.4.1	Fosfodiesterasa
3.1.4.5	Dosoxiribonucleasa
3.1.6.2	Esterol sulfatasa
3.2.1.17	Muramidasa (lisozima)
3.2.1.23	β -Galactosidasa
3.2.1.26	β -Fructofuranosidasa (Invertasa)
3.2.1.31	β -Glucuronidasa

3.2.1.-	Amilasa
3.2.1.-	Inulasa
3.2.1.-	(Maltasa)
3.4.3.1	Glicilglicina dipeptidasa
3.4.3.2	Glicilleucina dipeptidasa
3.4.4.-	Catepsina (s)
3.4.4.-	Peptidasa (s) no específica
3.5.1.1	Asparaginasa
3.5.1.2	Glutaminasa
3.5.3.1	Arginasa
3.5.4.4	Adenosin desaminasa
3.6.1.1	Pirofosfatasa inorgánica
3.6.1.7	Acilfosfatasa
3.6.1.8	ATPasa (libera pirofosfato)
3.6.1.-	ATPasa
4.1.2.7	Aldolasa
4.2.1.2	Fumarato hidratasa (Fumarasa)
4.2.1.3	Aconitato hidratasa (Aconitasa)
5.3.1.9	Glucosa fosfato isomerasa
5.3.3.1	Esteroides- Δ -isomerasa

Desde un punto de vista funcional la placenta es algo más que una simple membrana semipermeable. Hoy sabemos que está formada por tejidos de gran actividad metabólica, y se han encontrado en ella potentes sistemas enzimáticos.

El paso activo de sustancias nutritivas de la

madre al feto requiere la intervención de enzimas que catalicen este sistema de transporte. Además, es necesario también, un mecanismo metabólico capaz de suministrar la energía necesaria para que estos procesos se lleven a cabo. Esta energía viene proporcionada en forma de ATP y se origina en las células a través de los procesos normales.

Por otra parte, la placenta es un órgano metabólicamente importante, hasta el punto de asumir funciones de órganos de gran actividad como pueden ser el hígado o el riñón del adulto.

1.3.1 Capacidad enzimática de la placenta

La Tabla I muestra las enzimas que se han encontrado en la placenta. De ella podemos deducir la amplia capacidad metabólica de este órgano.

En la placenta podemos distinguir tres tipos de enzimas:

- 1) Las enzimas necesarias para mantener sus células en estado vivo.
- 2) Las enzimas encargadas de catalizar las reacciones necesarias para el transporte de materiales de la madre al feto y viceversa.
- 3) Las enzimas necesarias para cumplir funciones específicas en el metabolismo intermediario, o para actividades especializadas en la síntesis de proteínas y hormonas este-

roides.

La presencia de estas enzimas en algunos casos ha sido bien evidenciada porque han podido aislarse y purificarse parcialmente. En otros casos, se deduce que existen porque se conoce la función metabólica que cumplen.

1.3.1.1 Conversión de glucosa en fructosa

De la observación de esta tabla de enzimas deducimos que las características metabólicas de la placenta se parecen a las del hígado, pulmón y riñones o a las de algunas glándulas endocrinas, Pero además, encontramos alguna actividad que aparece específicamente en este órgano como por ejemplo la transformación de glucosa en fructosa.

1.3.1.1.1 A través de compuestos fosforilados.

La placenta humana convierte glucosa en fructosa a través de productos intermedios fosforilados y mediante

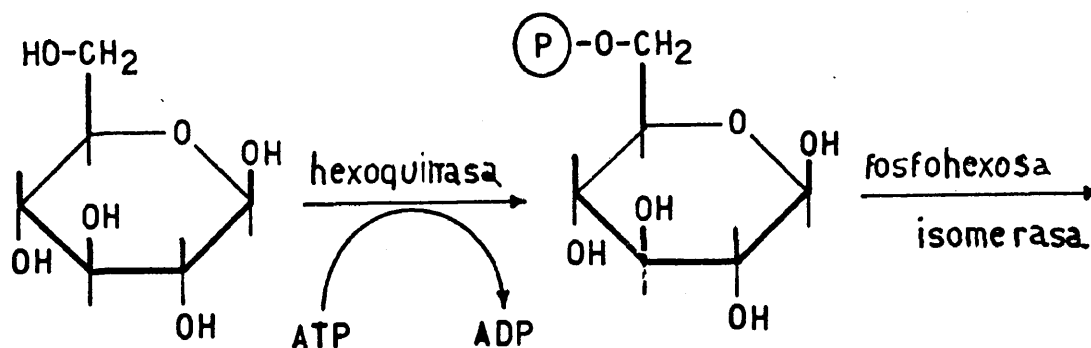


Fig. 11 Conversión de glucosa en glucosa-P

la intervención de enzimas como las hexoquinasas, isomera-

sas y fosfatasas. (Fig. 11 y 12)

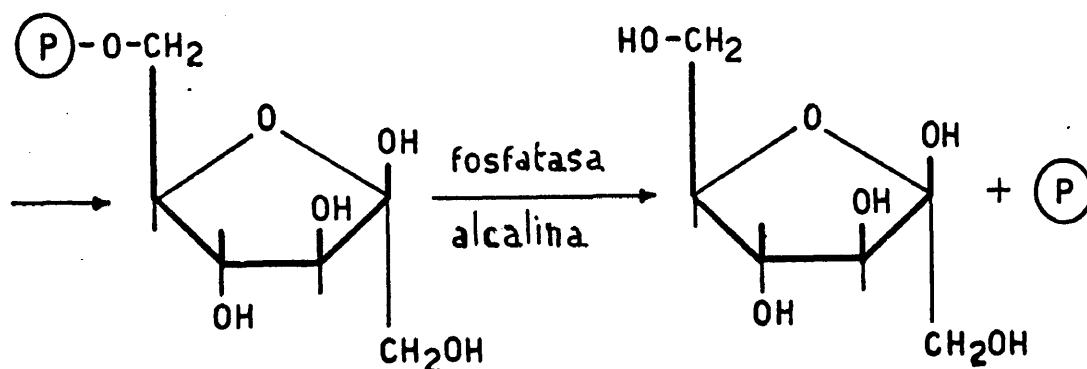


Fig. 12 Conversión de glucosa-P en fructosa

La fructosa así formada pasa al feto, donde es el azúcar más importante. El contenido de fructosa es más alto en el feto que en la madre.

Que la placenta puede producir fructosa fue demostrado "in vivo" por Huggett, 1954 (22) después que otros autores lo habían demostrado ya en estudios hechos "in vitro".

1.3.1.1.2 A través de sorbitol

Hers, 1957 (23) sugirió por primera vez que la glucosa podría ser convertida en fructosa a través de sorbitol, sin la intervención de intermediarios fosforilados.

Roux, Hagerman y Villee, 1959, (24) demostraron la transformación de sorbitol en fructosa en homogeneizados de placentas recogidas al final del embarazo. Y la conversión de glucosa-6-fosfato en fructosa libre en homogeneiza-

dos semejantes.

No obtuvieron sin embargo una clara evidencia del paso de glucosa sorbitol. Parecía que la glucosa pasaba a fructosa a través de compuestos intermedios fosforilados, como hemos visto anteriormente, más que por reducción a sorbitol y subsiguiente oxidación de sorbitol a fructosa.

Roux y col. 1959 (24) encontraron en la placenta la enzima sorbitol-dehidrogenasa y demostraron la conversión de sorbitol en fructosa. Sus resultados fueron confirmados por Ritter y Leuthardt, 1963 (25) en experiencias con extractos de tejido placentario. La vía encontrada es la que se muestra en la figura 13.

Cuando se ponía NADH, los extractos pasaban glucosa a sorbitol. En presencia de NADPH el sorbitol se oxidaba y pasa a fructosa.

En la placenta de oveja, que produce gran cantidad de fructosa a partir de glucosa, Britton y col., 1967, (26) han demostrado que el sorbitol es un intermediario en la síntesis de la fructosa.

Estos autores hablan de la intervención de dos tipos de enzimas: aldoreductasas y sorbitol-dehidrogenasas.

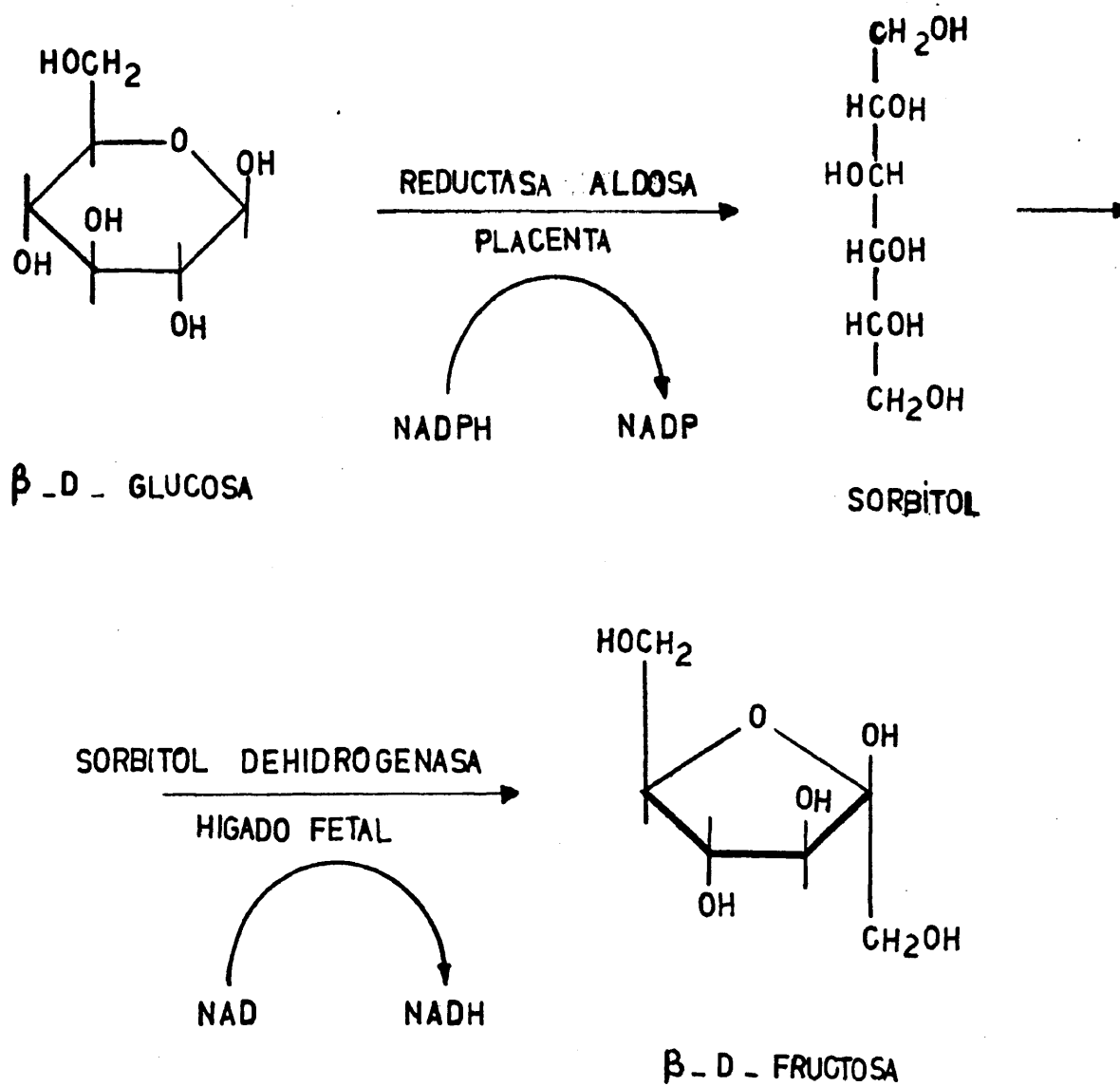


Fig. 13. Conversi3n de glucosa en fructosa a trav3s del sorbitol.

1.3.1.2 La placenta reguladora del metabolismo fetal

La placenta humana, como la de la mayoría de los mamíferos, contiene gran cantidad de glicógeno y un sistema enzimático capaz de transformarlo en glucosa durante los primeros meses del embarazo.

Pero la reserva de glicógeno y la actividad enzimática disminuyen a medida que avanza el embarazo de tal forma, que ordinariamente no se encuentra esta enzima en las placentas que se recogen al final del embarazo.

Ya Claude Barnard, 1871, había atribuido a la placenta el papel de "hígado transitorio", considerando la presencia de glucosa como un importante depósito gluco-regulador.

Esto es atribuible a que en el segundo trimestre el feto es todavía incapaz de regular su propio metabolismo, mientras que en el tercer trimestre va adquiriendo una autonomía metabólica.

Por lo tanto, el que la placenta inmadura se comporte como un órgano de activo metabolismo, tiene por misión el regular el metabolismo fetal, al mismo tiempo que provee a la nutrición del feto.

Si el feto nace después del séptimo mes de la vida intrauterina, aunque débil y prematuro, es ya capaz de nutrirse y vivir en el cosmos. No así, si nace antes de esta fecha. Esto quiere decir que la 28ª-30ª semana del embarazo marca una fecha crítica en el fisiología fetal, carac-

terizada por la adquisición de la autonomía metabólica.

Este séptimo mes, marca también un momento crucial en la evolución de la fisiología placentaria, que de un órgano tutor de la nutrición fetal se va a convertir ahora, en un órgano filtrante y pasivo.

1.3.1.3 Otras actividades enzimáticas

Del estudio de la Tabla I se deduce también que en la placenta están representadas todas las enzimas que toman parte en las vías metabólicas comunes a otros tejidos y órganos. Pero hay que señalar una notable excepción y es la ausencia de las enzimas requeridas para la ureogénesis, mientras que están presentes, como hemos dicho, las necesarias para la glicolisis, las de la vía metabólica de las pentosas-fosfato, las del ciclo de Krebs, etc.

Las células de la placenta pueden sintetizar, por tanto, ácidos grasos a partir de acetato o piruvato, y pueden sintetizar proteínas y ácidos nucleicos a partir de precursores sencillos.

1.4 GLANDULA ENDOCRINA

La placenta, además de ser un órgano de transporte entre la madre y el feto y un órgano metabólicamente activo, es también una importante glándula de secreción interna.

Durante el embarazo se da en la mujer una mayor producción de hormonas proteicas y esteroides, producidas, en gran parte, por la placenta.

Las hormonas de naturaleza proteica se encuentran exclusivamente en el tejido corial. Se conocen dos: la gonadotropina coriónica (HCG, human chorionic gonadotrophin) y el lactógeno placentario (HPL, human placental lactogen).

Las hormonas de naturaleza esteroide, estrógenos y progesterona, son las mismas sustancias que las producidas por otros tejidos endocrinos, pero con características distintas por lo que se refiere a sus vías biosintéticas. Son producidas por la placenta y están en relación directa con su función. Se forman en parte en el tejido corial y, en parte, en el feto (principalmente en la corteza suprarrenal). Para comprender la biogénesis de estas hormonas esteroides, es necesario introducir el concep

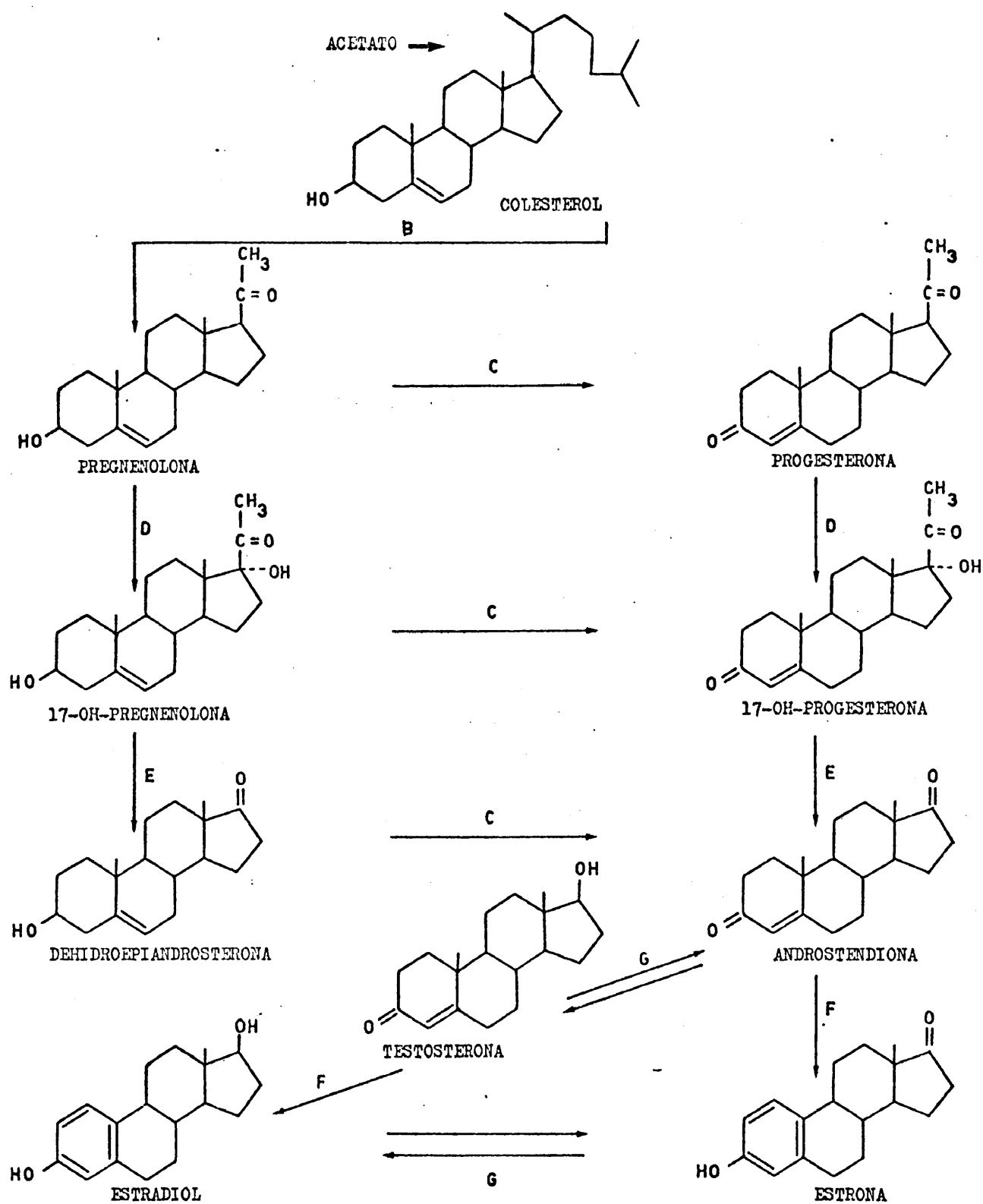


Fig. 14 Vías metabólicas para la biosíntesis de los estrógenos.

to de unidad feto-placentaria.

Hasta hace relativamente poco, la placenta se consideraba como un órgano esteroidegénico completo, capaz de sintetizar, como el ovario, el testículo y las glándulas suprarrenales, los estrógenos y la progesterona a partir de acetato. (Fig. 14)

Hoy sabemos que es necesario modificar este concepto, puesto que la placenta no es un órgano endocrino completo, Diczfalusy, 1962 (27), por lo menos en lo que se refiere a la producción de esteroides.

Igualmente se sabe que el feto carece de algunas actividades enzimáticas, fundamentales para la síntesis de las hormonas esteroides; de aquí que se hipotizara primero y se demostrara después, Diczfalusy, 1964 (28 y 29), una integridad funcional entre el feto y la placenta. De este modo la acción de los sistemas enzimáticos placentarios y fetales, se complementan mutuamente para constituir un sistema esteroidegénico que se llamó desde entonces "unidad feto-placentaria".

La Tabla que se pone a continuación, tomada de Villee, 1969 (30), muestra cómo se complementan las enzimas placentarias y fetales. (Tabla II)

TABLA II Actividad enzimática en la unidad feto-placenta

Enzimas	Placenta	Feto
3 β -hidroxiesteroide-dehidrogenasa	+ + +	+
C17-20 desmolasa	0	+ + +
17-hidroxilasa	0	+ + +
16 α -hidroxilasa	0 \rightarrow + ?	+ + +
21-hidroxilasa	0	+ \rightarrow + +
11 β -hidroxilasa	0	+ \rightarrow + + +
Sistema aromatizante	+ + +	0
Sulfatasas	+ + +	0
Sulfoquinasas	0	+ + +

* La actividad de las enzimas se expresa en una escala que va de 0 (no detectados por la mayoría de los investigadores) a + + + (enzimas muy activas tanto en estudios hechos "in vivo" como en los estudios "in vitro").

1.4.1 Hormonas proteicas

Como ya hemos dicho, son dos las hormonas proteicas detectadas en la placenta humana: la gonadotropina coriónica y el lactógeno placentario.

La gonadotropina coriónica aparece precocísimamente en el desarrollo embrionario. A los 9 días después de la ovulación ya es posible detectarla en la orina materna. Es una hormona sintetizada por el trofoblasto y actúa

manteniendo el cuerpo lúteo durante el embarazo.

El lactógeno placentario (HPL) fue detectado en el trofoblasto de la placenta humana tres semanas después de la ovulación.

1.4.1.1 Gonadotropina coriónica

Hoy se admite que, aunque muy parecida a la gonadotropina luteinizante hipofisaria (LH), la gonadotropina coriónica no es del todo igual a ella. En la actualidad no existen preparados químicamente puros de la gonadotropina coriónica, pero los estudios químicos de fracciones altamente purificadas, admiten que se trata de una glucoproteína que contiene hexosamina acetilada unida a dos moléculas de galactosa.

Tampoco su acción es exactamente superponible. Actuando sobre un ovario sin folículos maduros, no produce luteinización sino proliferación del intersticio. Si se administra a ovarios con folículos maduros, o en vías de maduración, tiende a producir folículos hemorrágicos, teniendo una acción más levemente luteinizante que los extractos hipofisarios. Sin embargo, la inyección de gonadotropina coriónica mantiene el cuerpo amarillo durante espacios de tiempo mayores que la gonadotropina hipofisaria, de donde se ha dicho que si bien su acción es menos luteinizante, en cambio es más luteotrófica.

La mayor eliminación de gonadotropina coriónica

corresponde a los primeros meses de la gestación, teniendo un pico aproximadamente entre los 30 y los 60 días. Más adelante la gonadotropina eliminada por la orina, desciende. (Fig. 15)

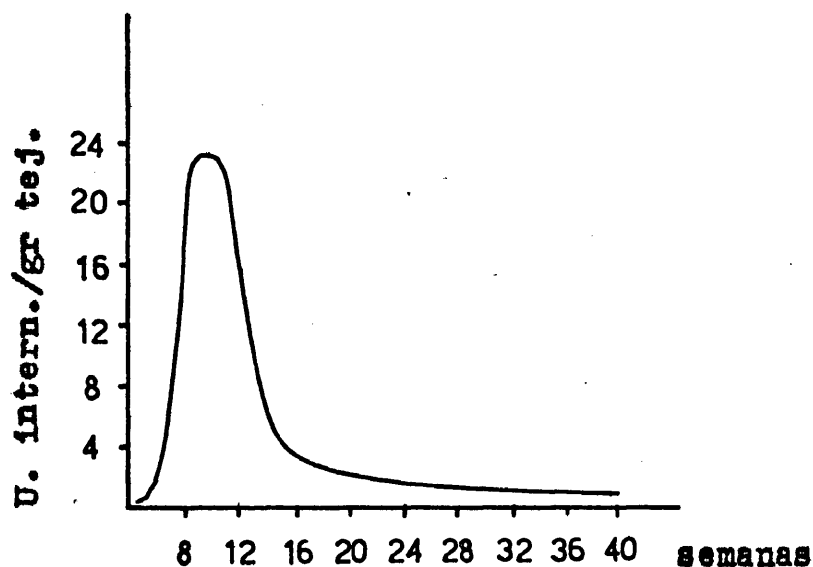


Fig. 15 Producción de gonadotropina coriónica Según Diczfalusy.

Esto hace pensar que la gonadotropina coriónica tiene como finalidad el hacer persistir el cuerpo lúteo gravídico. Durante la gestación, el cuerpo amarillo de la última menstruación se mantiene y dura en la especie humana hasta el final del tercer mes. la hormona segregada por él, la progesterona, es necesaria para el mantenimiento del embarazo, por ser ésta una hormona de propiedades progestacionales, favorecedora de la nutrición fetal hasta que la placenta forme su progesterona propia al final del tercer mes.

La formación de esta hormona en el cuerpo amarillo viene mantenida así hasta ese momento por la acción de la gonadotropina coriónica. A partir del tercer mes la acción mantenedora del cuerpo amarillo ya no es necesaria y la cantidad de gonadotropina corial efectivamente disminuye.

1.4.1.2 Lactógeno placentario

Esta hormona descrita por Ito y Higashi, 1961, (31) fue aislada más tarde por Josimovich y Mac Laren, 1962 (32). Su actividad prolactínica, su semejanza con la hormona humana del crecimiento y sus propiedades diabetogénicas, sugieren que la HPL es una hormona metabólicamente importante para la gestación.

Se forma en la placenta, pero se encuentra muy poca en la sangre fetal. De aquí se ha deducido que no atraviesa la membrana placentaria y que su papel en el embarazo lo ejerce únicamente a través de la madre. Un gran número de interesantes cambios metabólicos que tienen lugar durante el embarazo se consideran relacionados con la actividad de la HPL en el organismo materno. Muchos de estos cambios toman parte en el origen de la diabetes materna y pueden producirse inyectando HPL en mujeres no gestantes.

Grunbach y sus colaboradores que en 1968 (33) estudiaron estos cambios metabólicos, postulan que la HPL es "hormona de crecimiento" durante la primera mitad del

embarazo, que es segregada por la placenta proporcionalmente a su masa y que la secreción es unidireccional hacia la circulación materna.

La HPL induce la lipólisis y el incremento de los ácidos grasos libres en el plasma, que proveen energía para el metabolismo materno. La HPL inhibe el aumento de glucosa y la gluconeogénesis en la madre, separando la glucosa de la proteína.

La acción insulinogénica de la HPL conduce a niveles altos de insulina. Este aumento de insulina favorece la síntesis de las proteínas y asegura una fuente móvil de aminoácidos que serán transportados al feto.

La HPL se puede detectar en el plasma de mujer embarazada a partir de la sexta semana de gestación y aumenta continuamente durante el primero y segundo trimestre. En la sangre, el nivel de HPL muestra pequeñas variaciones.

La HPL desaparece de la sangre inmediatamente después del parto, con un tiempo medio en el suero de alredor de 30 minutos.

En la figura que se pone a continuación (Fig.16) se puede ver la representación del lactógeno placentario en el plasma a lo largo del embarazo. La determinación se hizo con medios radioinmunológicos.

En esta figura observamos una gran subida en la producción de la HPL en el momento del parto (valor máximo)

para desaparecer luego casi inmediatamente.

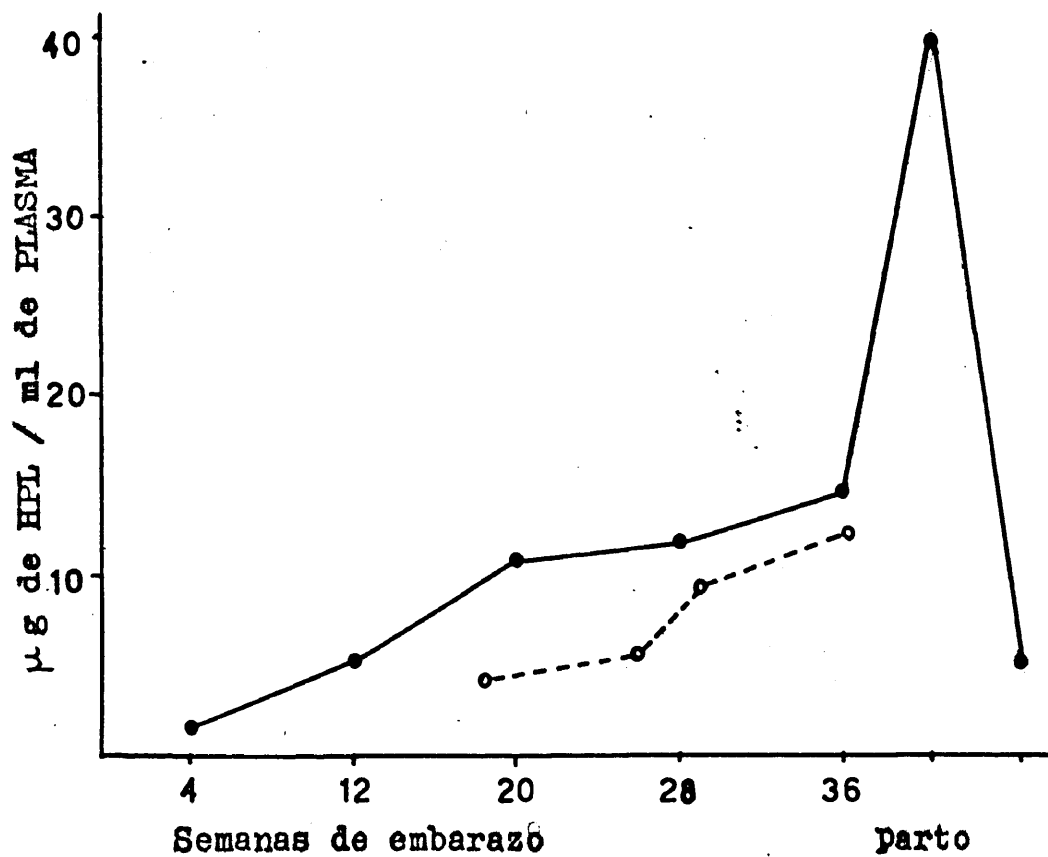


Fig. 16 Lactógeno placentario (HPL) en el plasma a lo largo del embarazo. De terminación radioinmunológica.

—— Según Beck y col.
----- Según Selenkow y col.

1.4.2 Hormonas esteroides. Unidad feto-placentaria.

Desde hace tiempo se sabe que el pregnandiol -catabolito de la progesterona- y los estrógenos, son los esteroides cuantitativamente más importantes y que aumentan progresivamente en la orina de la mujer embarazada alcanzando al final del embarazo valores que superan enormemente a los encontrados durante el ciclo menstrual. Para el pregnandiol son aproximadamente diez veces mayores; para la estrona, cien; y para el estriol alrededor de mil veces más altos.

Las hormonas esteroides alcanzan los valores máximos en el momento del parto.

Se han excluido la hipófisis, las glándulas suprarrenales y el ovario maternos, como responsables de esta gran producción de hormonas durante el embarazo. Por lo menos, a partir del segundo mes de gestación. Antes de este tiempo, sabemos que el cuerpo lúteo contribuye mucho a la producción de este grupo de esteroides.

Desde que Halban, 1905 (34) formuló el concepto de que la placenta tiene funciones de órgano endocrino, se han acumulado innumerables pruebas, basadas en observaciones químicas y clínicas, de que este órgano es la fuente principal de los estrógenos durante la gestación.

Diczfalusy, 1953 (35) publicó un estudio detallado de la cantidad y concentración de los estrógenos en la placenta humana. Meyer, 1955 (36) demostró que el teji

do placentario era capaz de transformar androstendiona (androst-4-eno-3,17-diona) en estrona (3-hidroxiestra-1,3,5 (10)-trien-17-ona) y Baggett, 1959 (37) demostró la conversión de testosterona (17 β -hidroxiandrost-4-en-3-ona) en estrógenos por el mismo tejido. Por analogía con otros órganos endocrinos que se habían estudiado hasta entonces, se postuló que la placenta producía estrona, estradiol (estro-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol) y estriol (estra-1,3,5 (10)-trieno-3,16 α -17 β -triol) a partir de acetato, formando colesterol (colest-5-en-3 β -ol), pregnenolona (3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona), progesterona (pregn-4-eno-3,20-diona), 17 α -hidroxiprogesterona y androstendiona como productos intermedios.

Sin embargo, cuando se intentó experimentar esta vía metabólica, los resultados indicaron claramente que la producción de estrógenos durante la gestación, era un proceso mucho más complejo.

1.4.2.1 Biosíntesis de la progesterona

Se sabe hoy con certeza que la placenta secreta progesterona. La excreción del pregnandiol (5 β -pregnano-3 α ,20 α -diol) a través de la orina de la mujer embarazada es el medio que tenemos para detectar esta producción de progesterona.

Se ha inyectado colesterol marcado con carbono radioactivo (C¹⁴), a animales de experimentación y se ha

podido demostrar la formación de progesterona radioactiva en la placenta. Por lo tanto, este órgano, es comparable al cuerpo amarillo y a las glándulas suprarrenales en la capacidad progestopoyética.

Durante el embarazo puede dejar de funcionar el ovario y el cuerpo amarillo, sin que por eso, desaparezca la formación de progesterona; y también el pregnandiol urinario continúa excretándose.

La progesterona parece que tiene la misión de proteger el embarazo. En la especie humana pueden dejar de actuar los ovarios sin que se produzca el aborto, gracias a que la placenta produce progesterona supletoria.

La formación de progesterona en la placenta aparece en cantidades progresivas y es segregada en máxima cantidad al final de la gestación.

Al principio del embarazo, la cantidad de progesterona circulante y el pregnandiol excretado en orina, proceden del cuerpo amarillo. Sólo a partir del tercer mes, la progestopoyésis placentaria cumple una misión definida.

Ni la supresión de la actividad de los ovarios maternos (38 y 39) ni de la influencia del feto (40), suprimen la excreción de pregnandiol en la orina materna. Pacientes con enfermedad de Addison, mantienen también un nivel normal en la excreción de pregnandiol. De aquí se dedujo claramente que la placenta es, sin lugar a dudas, la fuente principal, si no la única, de las enormes canti

dades de progesterona que se forman durante la gestación.

Las preparaciones de tejido placentario son capaces de convertir acetato en colesterol, pero en pequeñísimas cantidades (0'002%), Van Leusden y Villee, 1965 (41) Zelewski y Villee, 1966 (42).

También se encuentra una pequeñísima conversión de acetato en colesterol haciendo perfusiones de placentas humanas "in vitro", Levitz y col., 1962 (43).

Se ve que la capacidad de la placenta para transformar acetato en colesterol es muy limitada. Y por supuesto, insuficiente para explicar la alta concentración de pregnandirol y estrógenos en la orina materna.

Por otra parte, resulta claro, tanto de perfusiones hechas "in vitro", como de perfusiones "in situ", que la placenta es capaz de convertir colesterol en pregnenolona (Fig. 17) en grandes cantidades, Solomon y col., 1954

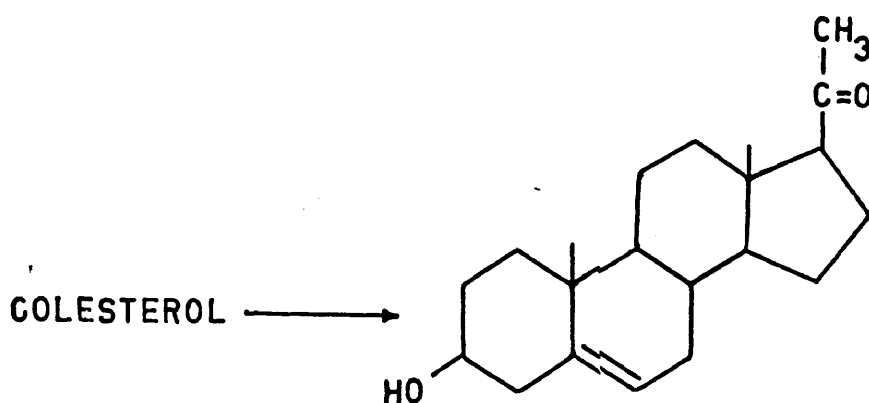


Fig. 17 Conversión de colesterol en pregnenolona

(44), Solomón, 1960 (45), Morrison y col., 1965 (46), Jaffe, Erikson y Diczfalusy, 1965 a (47), Jaffe y Peterson, 1966 (48).

Y también que es capaz de convertir colesterol en progesterona, e igualmente en grandes cantidades (Fig.18)

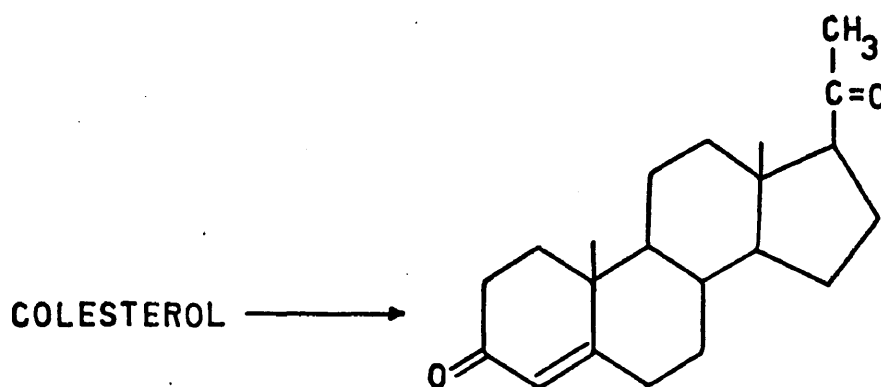


Fig. 18 Conversión de colesterol en progesterona

Solomón, 1960 (45), Morrison y col., 1965 (46), Ryan y col. 1966 (49), Maeyama y col, 1968 (50). Esto hizo pensar que el principal precursor de la gran cantidad de progesterona formada por la placenta, tiene que ser el colesterol de la circulación materna.

Recientes estudios apoyan esta teoría y demuestran que la progesterona que se encuentra en el tejido placentario y en la circulación materna, muestran la misma actividad específica, tanto en el colesterol marcado, presente en la circulación materna, como en el pregnandi^{ol} urinario del feto, Hellig y col., 1968 (51).

Finalmente, preparaciones de tejido placentario al final del embarazo, han demostrado posible la hidrólisis del colesterol-3-sulfato, French y Warren, 1966, (52). Pero la contribución del colesterol-sulfato circulatorio a la esteroideogénesis de la placenta es aún desconocida.

La pregnenolona es fácilmente convertida en progesterona por la placenta, pero los pasos siguientes del metabolismo son muy limitados (53).

El mayor catabolito de la progesterona es el 20 α -dehidroprogesterona, encontrado en la placenta en la mitad del embarazo (54), y al final (55). Se forman también pequeñas cantidades de 6 α y 6 β -OH-progesterona (55-56). Sin embargo no se produce la 17-hidroxilación (53-54), y por lo tanto, no se pueden formar ni andrógenos ni estrógenos en la placenta, a partir de pregnenolona y progesterona. (Fig. 19)

La placenta tiene en pequeñísima cantidad, o no tiene por tanto, 17-hidroxilasas, 21-hidroxilasas, 11-hidroxilasas o 17-20 desmolases. Algunos autores han encontrado pequeñas cantidades de 16-hidroxilasas en placentas a la mitad del embarazo (57-58).

La placenta no puede sintetizar glucocorticoides, mineracorticoides, andrógenos o estrógenos, a partir de la progesterona que produce en grandes cantidades. Pero puede sin embargo, sintetizar estrógenos y andrógenos a partir de precursores de 19 átomos de carbono que le verdrán suministrados por el feto.

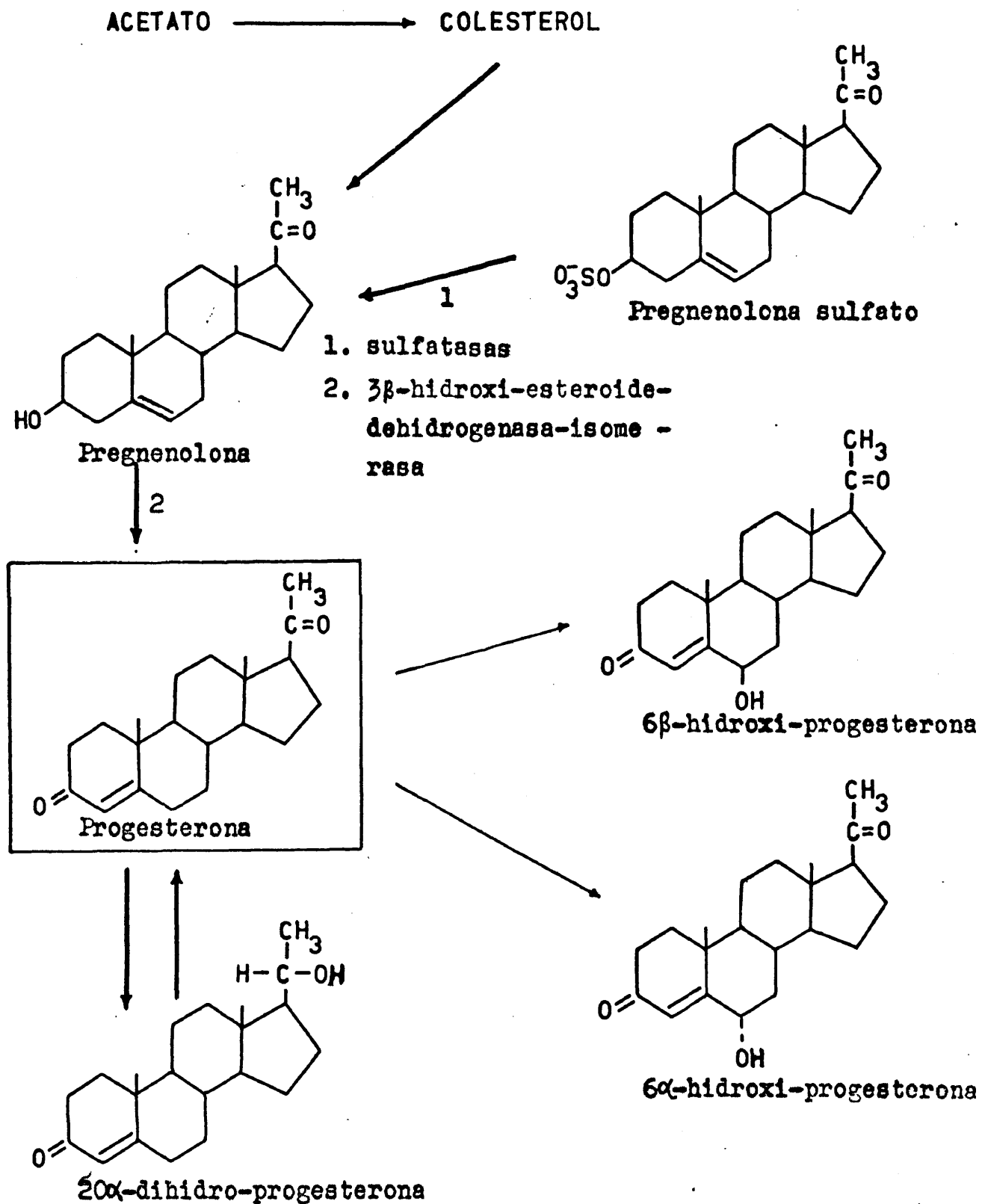


Fig. 19 Metabolismo de la progesterona en la placenta

Tanto la pregnenolona como la progesterona producidos por la placenta, pueden pasar al feto. Pero el feto (y especialmente la corteza suprarrenal del feto) no contiene 3β -hidroxi-esteroides-dehidrogenasas. De aquí que la pregnenolona formada por el feto o recibida en la placenta no se convierte fácilmente en progesterona en el feto.

Sin embargo la corteza suprarrenal del feto, hidroxila la pregnenolona (en el hígado) en su 16α ó 17 posición. Y la 17 -hidroxipregnonolona es el único camino que, por la acción de las desmolases, conduce de un modo cuantitativamente importante, a la formación de dehidroepiandrosterona (3β -hidroxiandrost-5-en- 17 -ona).

Este compuesto será sometido en el hígado del feto a la 16α -hidroxilación para formar el 16α -hidroxi-epiandrosterona que con la dehidroepiandrosterona y los sulfatos correspondientes, serán los productos más significativos del metabolismo de la pregnenolona en el feto.

La figura 20 muestra el cuadro general del metabolismo de la pregnenolona en el feto.

La progesterona que llega al feto procedente de la placenta dará lugar a los corticosteroides.

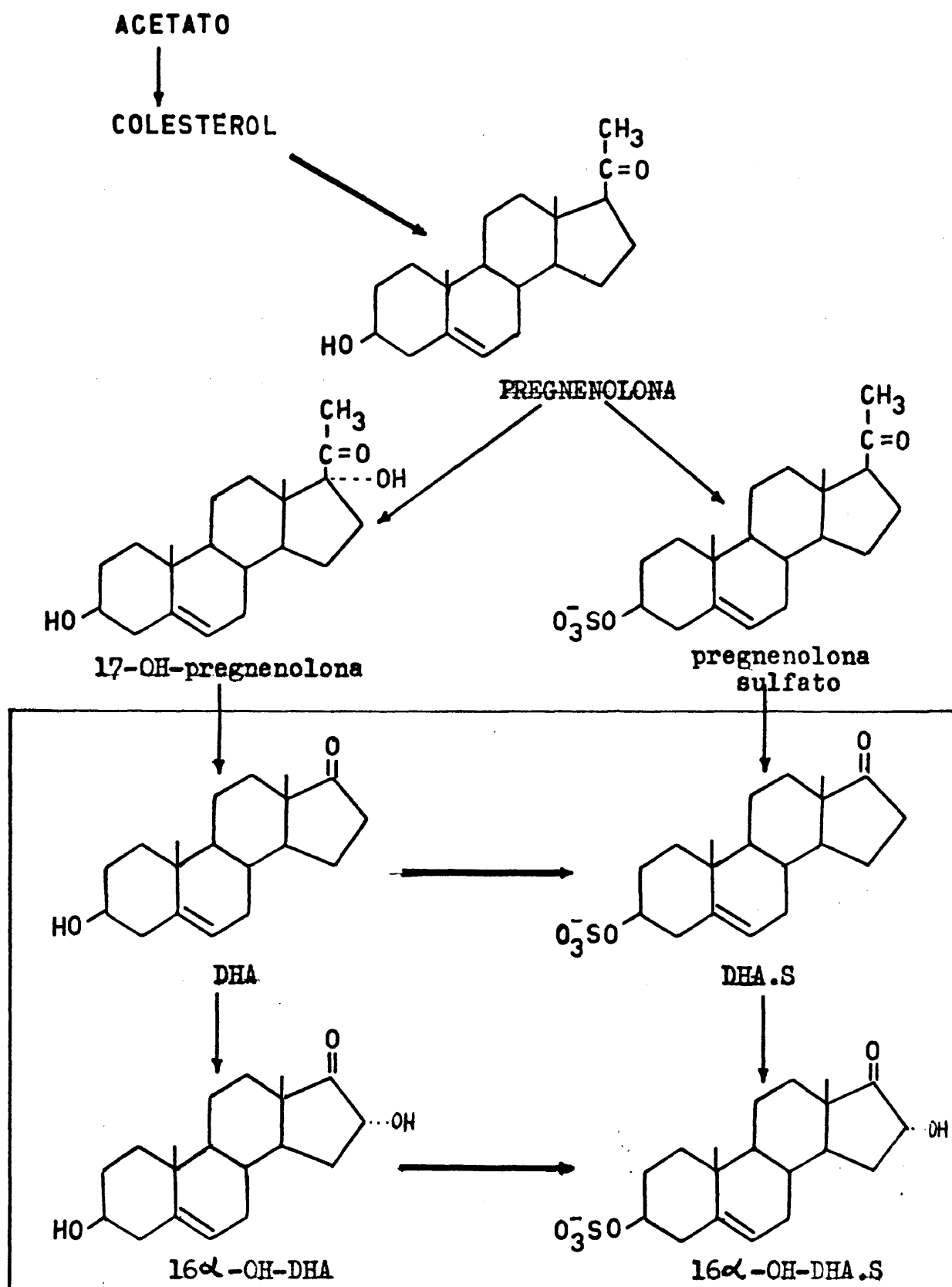


Fig. 20 Metabolismo de la pregnenolona en el feto

1.4.2.2 Biosíntesis de andrógenos y corticosteroides.

Derivan del metabolismo de la progesterona. Una parte de la progesterona placentaria pasa a las glándulas suprarrenales del feto, y allí se transforma de modo semejante a como lo hace en la placenta.

La eliminación de corticoides por la orina y su tasa en plasma, tiene valores que van aumentando hasta el final de la gestación como ocurre con el resto de las hormonas esteroideas.

Como sabemos, en la placenta hay una continua conversión de pregnenolona en progesterona (Fig. 21), que

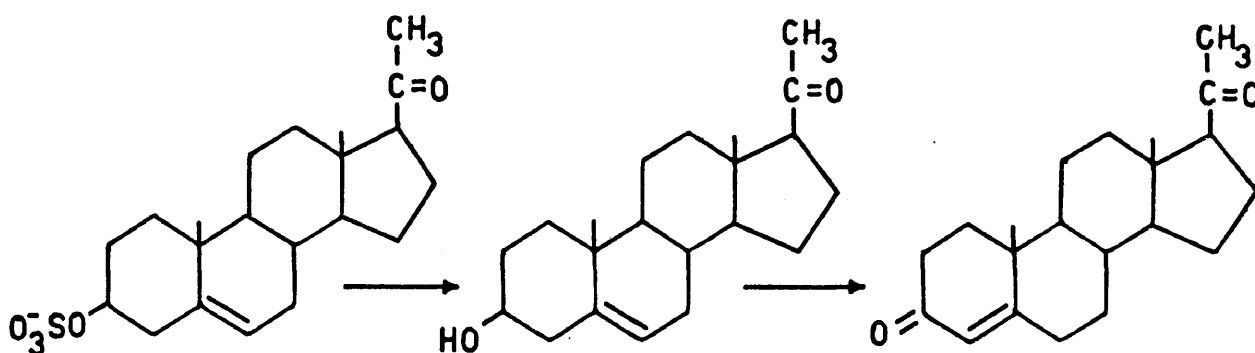


Fig. 21 Conversión de pregnenolona sulfato en progesterona

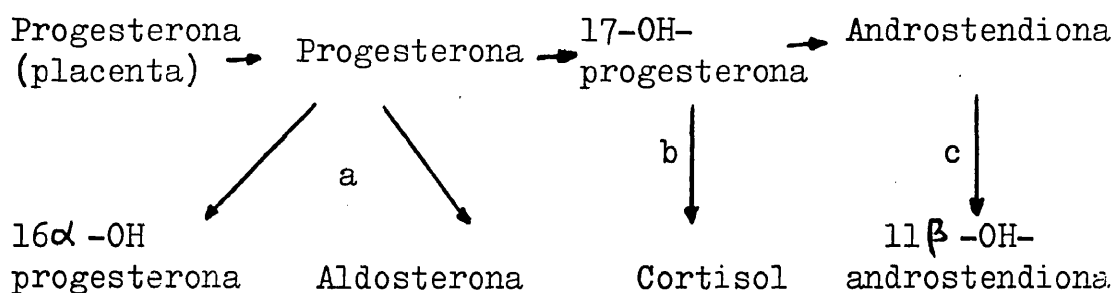
pasa luego hacia la madre y hacia el feto. Para estudiar el significado de la secreción de progesterona hacia el feto, se han hecho autoradiografías de fetos perfundidos con progesterona marcada. En las suprarrenales fetales se encontró un acúmulo de radioactividad mucho más grande que

en todos los demás órganos. Para discernir si se trataba de un acúmulo de progesterona o de metabolitos de progesterona se pensó en estudiar la naturaleza del material ra dioactivo de las suprarrenales del feto (59, 60 y 61). De estas suprarrenales se aislaron: cortisol (11β , 17α , 21 -trihidroxipregn-4-eno-3,20-diona), corticosterona-sulfato, desoxicorticosterona-sulfato, 17α -hidroxiprogesterona, 16α -hidroxiprogesterona.

No se encontró androstendiona, que es un metabolito característico de la progesterona, después de la incubación de las suprarrenales fetales (62).

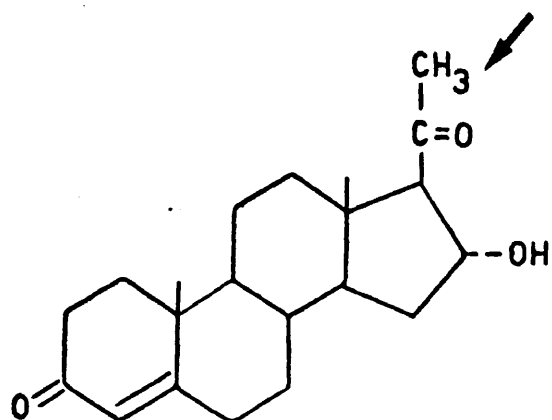
Visto que tanto el cortisol como la corticosterona (11β , 21 -dihidroxipregn-4-eno-3,20-diona) se han podido aislar también del perfusado, se puede concluir que el feto humano, en el segundo trimestre del embarazo, puede sintetizar y secretar los corticosteroides más importantes utilizando la progesterona placentaria como precursor.

(Fig. 22 a, b, c)

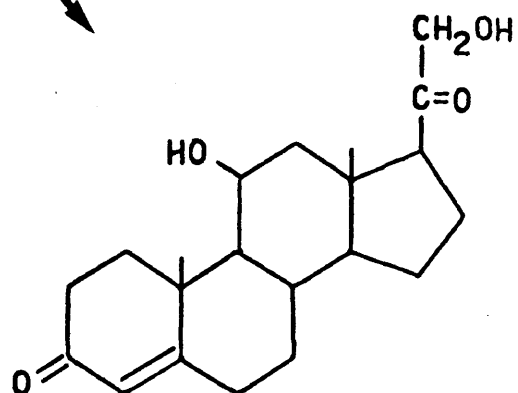


Estas conclusiones han sido confirmadas por experimentos en que fetos desprovistos de suprarrenales se han perfundido con progesterona y no se han encontrado cor

PROGESTERONA



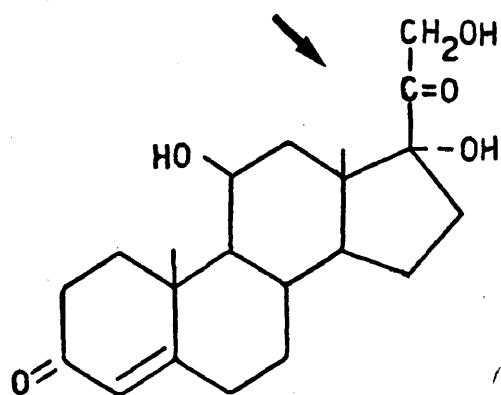
16 α -hidroxi-
progesterona



Corticosterona
ALDOSTERONA

22 a

17-hidroxi-PROGESTERONA

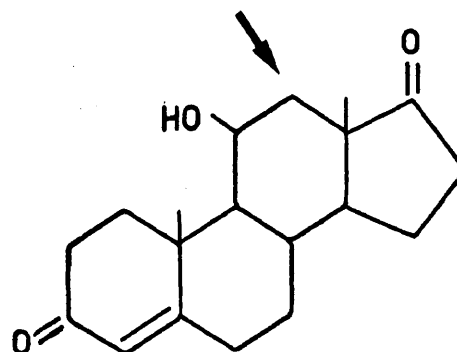


CORTISOL

22 b

22 c

ANDROSTENDIONA



11 β -hidroxi-androstendiona

ticosteroides marcados ni en el feto ni en el perfundido (61), mientras que se han podido aislar en igual cantidad todos los productos de reducción encontrados en los fetos perfundidos sin quitarles las suprarrenales. Además es posible que una parte del cortisol presente en el organismo fetal sea de origen materno (62).

La progesterona se somete a varias reacciones de hidroxilación en las suprarrenales del feto y allí se forman los corticosteroides más importantes, los cuales son secretados de las suprarrenales fetales hacia la placenta.

La progesterona sufre en los diversos tejidos fetales además, un metabolismo reductivo (61, 63 y 64)

Una parte de estos compuestos reducidos, especialmente el 20α -dehidroprogesterona, se convierten de nuevo en progesterona, al volver a la placenta. (64 y 65)

1.4.2.3 Biosíntesis de los estrógenos

Durante el embarazo, los estrógenos (y principalmente el estriol), aumentan progresivamente en la orina materna, llegando a alcanzar valores alrededor de mil veces mayores que los que se encuentran en la orina durante el ciclo menstrual.

En estos últimos años se ha podido constatar que la excreción de estriol en la orina materna, refleja

el estado funcional de la placenta y el grado de desarrollo del feto.

Situaciones de insuficiencia placentaria o de sufrimiento fetal, coinciden frecuentemente con valores de estriol más bajos que los valores medios normales, y la muerte intra-uterina del feto, lleva siempre a valores que disminuyen progresivamente, hasta alcanzar cifras iguales o inferiores a las del estado de no gestación, Frandsen y Stakemann, 1962 (66).

Para la biosíntesis de los estrógenos durante la gestación se requiere la colaboración de tres compartimientos anatómicos distintos: el organismo materno, la placenta y el feto, como veremos a continuación.

Incubaciones de tejido ovárico con precursores marcados, demuestran que la estrona y el estradiol pueden ser sintetizados a partir de acetato (67), de colesterol (68) de la pregnenolona (69) y la progesterona. (Fig. 14)

Sin embargo perfusiones de la placenta con acetato y colesterol (43), pregnenolona, 17-hidroxipregnenolona, progesterona, 17 α -hidroxi-progesterona (65, 70 y 71), no han dado lugar a la formación de estrógenos. La administración de progesterona marcada a la madre, no ha supuesto una conversión satisfactoria en estrógenos marcados (72, 73).

Estos datos sugieren, en contra de anteriores opiniones (74, 75), que la placenta no es capaz de producir estrógenos a través del mismo mecanismo biosintético

del ovario (fig. 14), es decir, a partir de acetato, colesterol o precursores de 21 átomos de carbono.

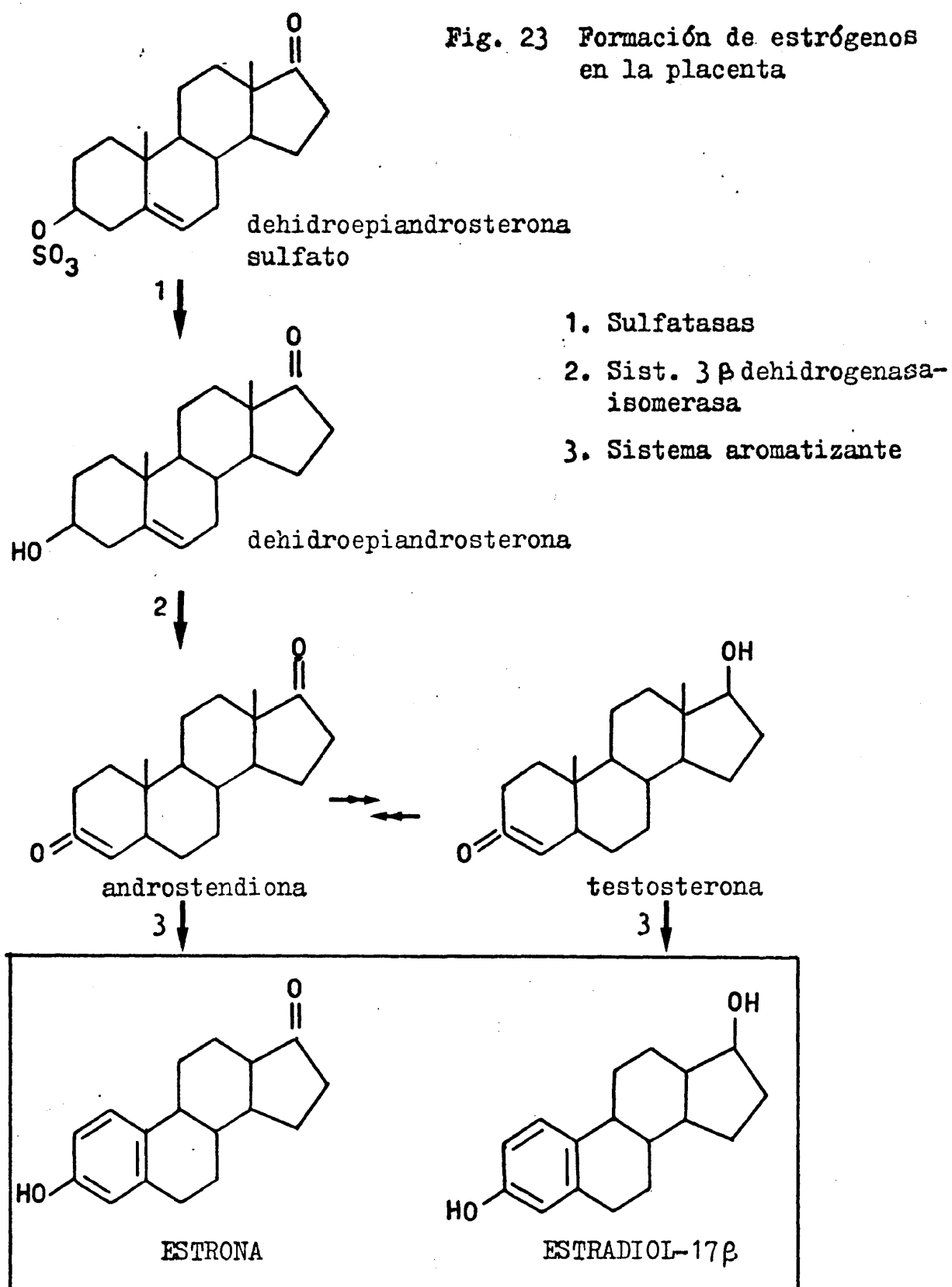
Por otra parte, incubaciones de tejido placentario con esteroides de 19 átomos de carbono (andrógenos) como por ejemplo, 19-hidroxiandrostendiona (19-hidroxiandrost-4-eno-3,17-diona), androstendiona, testosterona, dehidro-epiandrosterona, dehidroepiandrosterona-sulfato, androsten-triol (36, 37, 76, 77, 78, 79, 80, 81 y 82), dan lugar a los estrógenos correspondientes con rendimientos muy altos. De ellos, la androstendiona y la testosterona que poseen propiedades androgénicas muy acusadas, parecen los menos probables, ya que la cantidad que de ellos se necesita para la producción de estriol, indudablemente conduciría a la masculinización de los fetos de sexo femenino. La dehidroepiandrosterona en cambio, y mejor aún su sulfato, que carecen de efectos androgénicos, poseen todos los requisitos para servir de precursores de los estrógenos en el conjunto feto-placenta.

La administración endovenosa de dehidroepiandrosterona-sulfato marcado a una mujer embarazada ha dado lugar a una conversión masiva en estrógenos urinarios marcados (73, 83, 84 y 85), mientras que la administración de dehidroepiandrosterona-sulfato marcado a mujeres no embarazadas no ha dado lugar a la formación de estrógenos urinarios marcados (86).

Estos experimentos indican que la placenta es la responsable de la conversión de andrógenos en estróge-

nos (Fig. 23). Indican también que la vía principal para

Fig. 23 Formación de estrógenos en la placenta



la síntesis de los estrógenos durante la gestación, consiste en la aromatización placentaria de los andrógenos maternos y fetales.

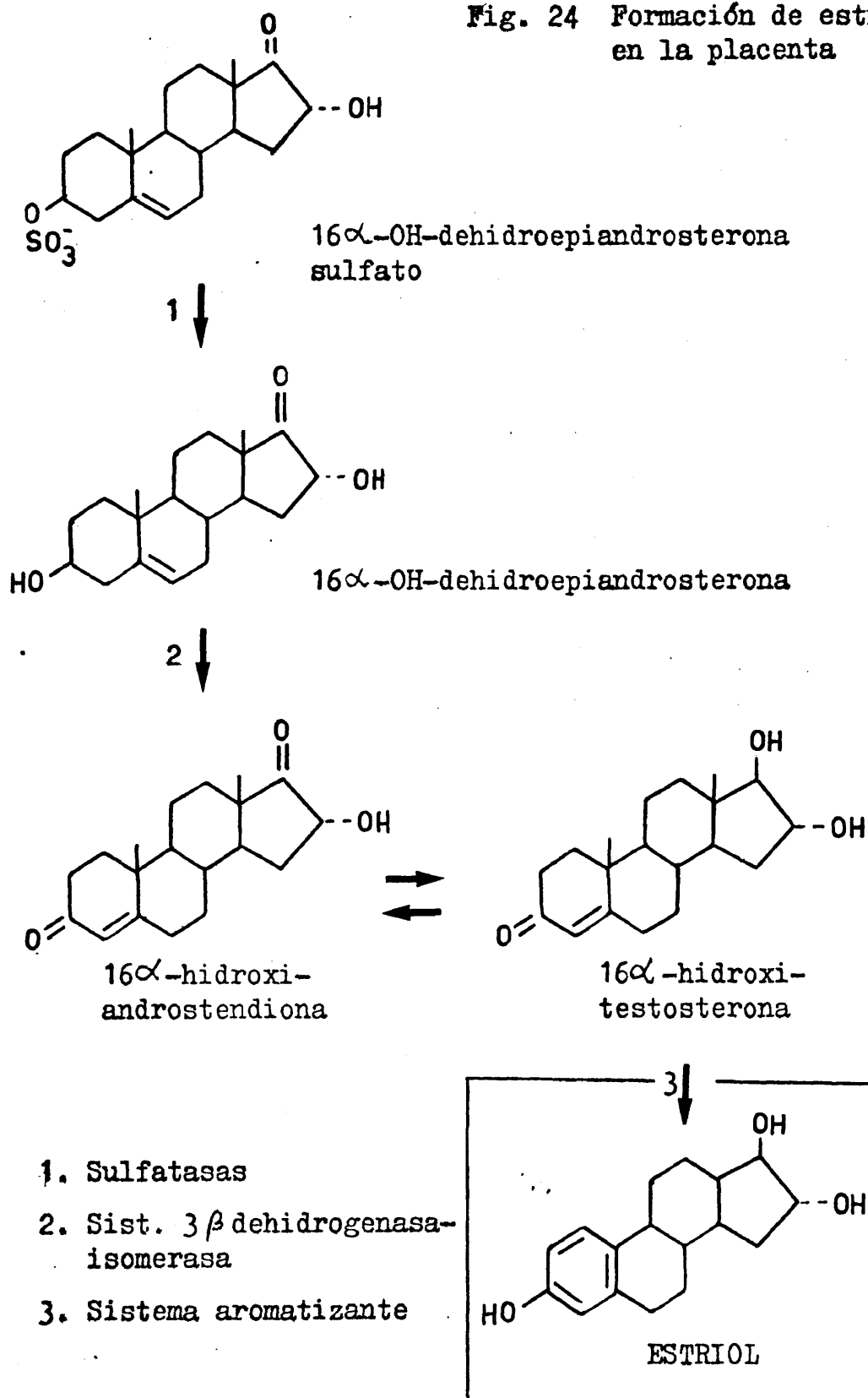
Haciendo perfusiones de placenta "in situ", con diversos andrógenos, como dehidro-epiandrosterona sulfato, dehidroepiandrosterona, androstendiona, testosterona, se han aislado cantidades considerables de estrona y estradiol en la placenta, pero no se ha encontrado en ningún caso estriol, a partir de estos precursores andrógenos.

Sin embargo se ha podido encontrar estriol, a partir de perfusiones de tejido placentario hechas con andrógenos hidroxilados en posición 16, como por ejemplo: 16 α -OH-dehidro-epiandrosterona, 16 α -OH-androstendiona (16 α -hidroxandrost-4-eno-3,17-diona), 16 α -OH-testosterona (16 α ,17 β -dihidroxandrost-4-en-3-ona). (87) (Fig. 24).

Se hicieron otros experimentos introduciendo de hidroepiandrosterona marcada con C¹⁴, en la circulación feto-placentaria y dehidroepiandrosterona - sulfato marcado con H³ en la circulación materna. Se observó que al determinar los estrógenos en la orina, había una relación estriol/estrona + estradiol mucho más alta para el C¹⁴ que para el H³ (84).

Estos datos sugirieron que en la relación con la estrona y estradiol, se forma más estriol en el sistema feto-placentario que en el sistema materno-placentario. De aquí se deduce que la 16-hidroxilación, reacción clave para la formación del estriol, es una función fetal y no pla

Fig. 24 Formación de estriol en la placenta



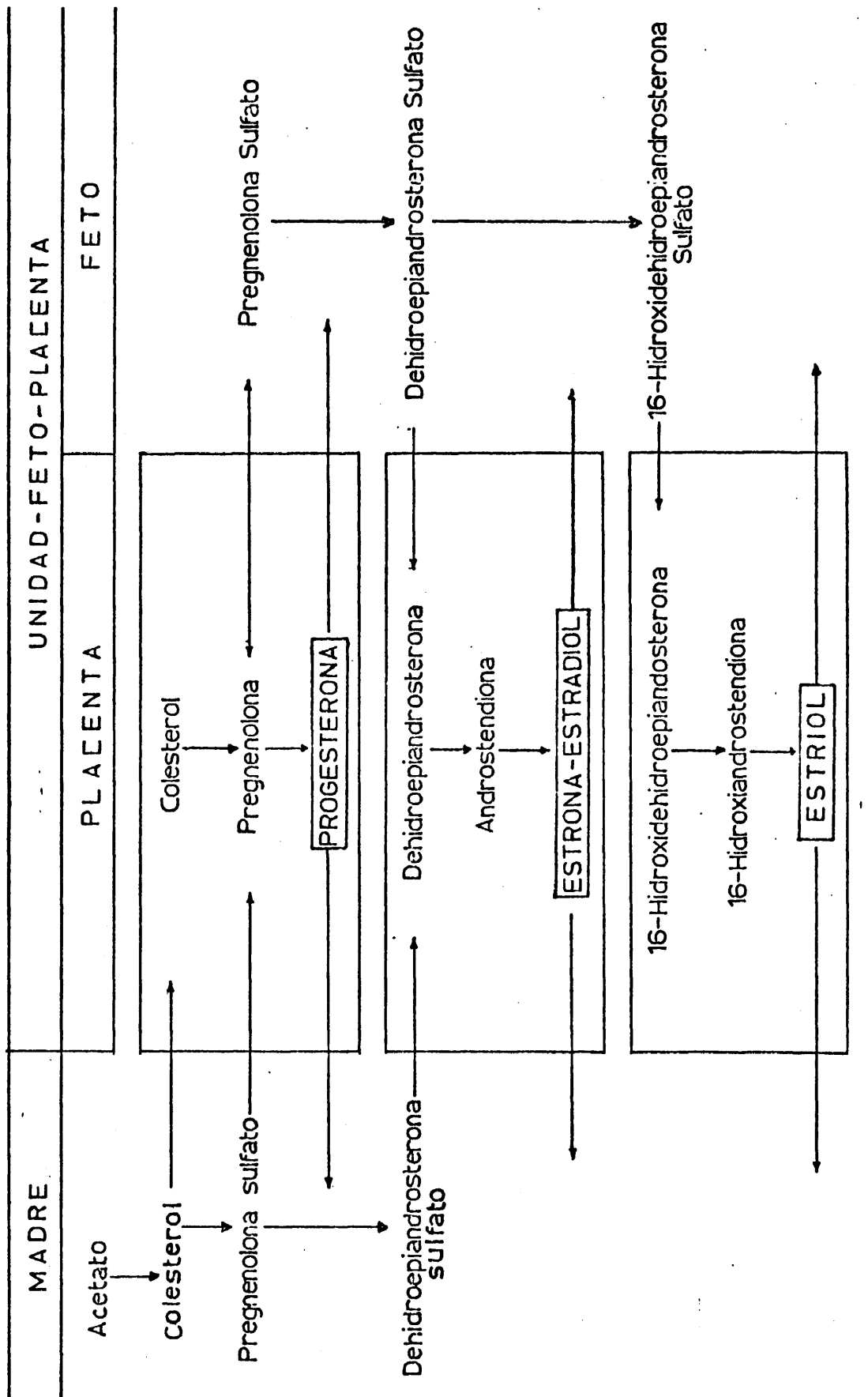
centaria.

Esta misma constatación fue confirmada haciendo perfusiones fetales de dehidroepiandrosterona-sulfato y de hidroepiandrosterona (88) donde se puede aislar gran cantidad de androstendiol (androst-5-eno-3 β -17 β -diol) del hígado fetal.

En experimentos en que se introdujo estrona y estradiol en la circulación feto-placentaria se ha observado una masiva conversión en estriol y se ha podido demostrar que la conversión tiene lugar solamente en el tejido fetal (89).

Todos estos resultados han hecho pensar que la síntesis de la mayor parte de los estrógenos durante la gestación tiene lugar en la unidad feto-placentaria, y que las funciones enzimáticas están distribuidas entre la placenta y el feto de modo que mientras 16 α -hidroxilación tiene lugar en el organismo fetal, principalmente en el hígado, la aromatización es fundamentalmente una función placentaria. (Esquema B)

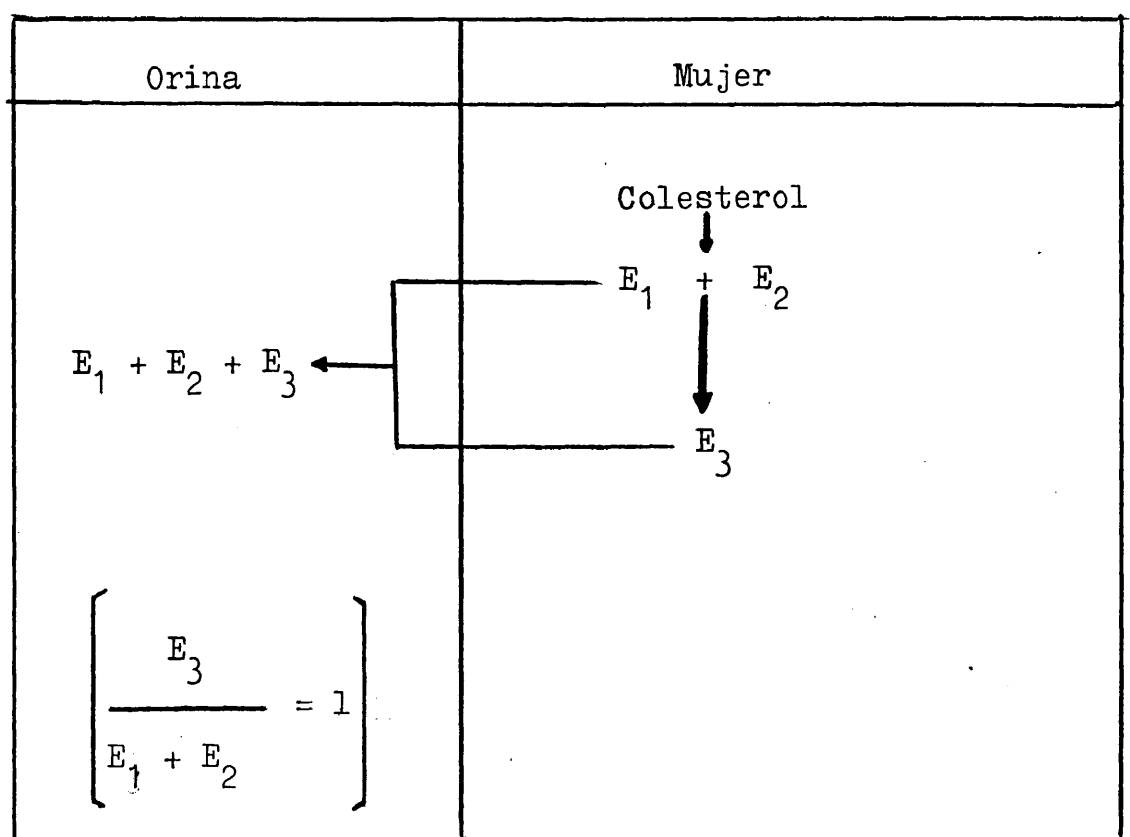
En términos enzimáticos podemos decir, que el organismo fetal tiene una carencia sulfatásica y 3 β -ol-dehidrogenásica, mientras que estas actividades enzimáticas se encuentran abundantemente representadas en la placenta. Por otra parte, el hígado fetal, puede efectuar la 16 α -hidroxilación de los esteroides neutros o fenólicos, capacidad que no encontramos en la placenta. Estudios recientes demuestran que la 16 α -hidroxilación tiene lugar preferen-



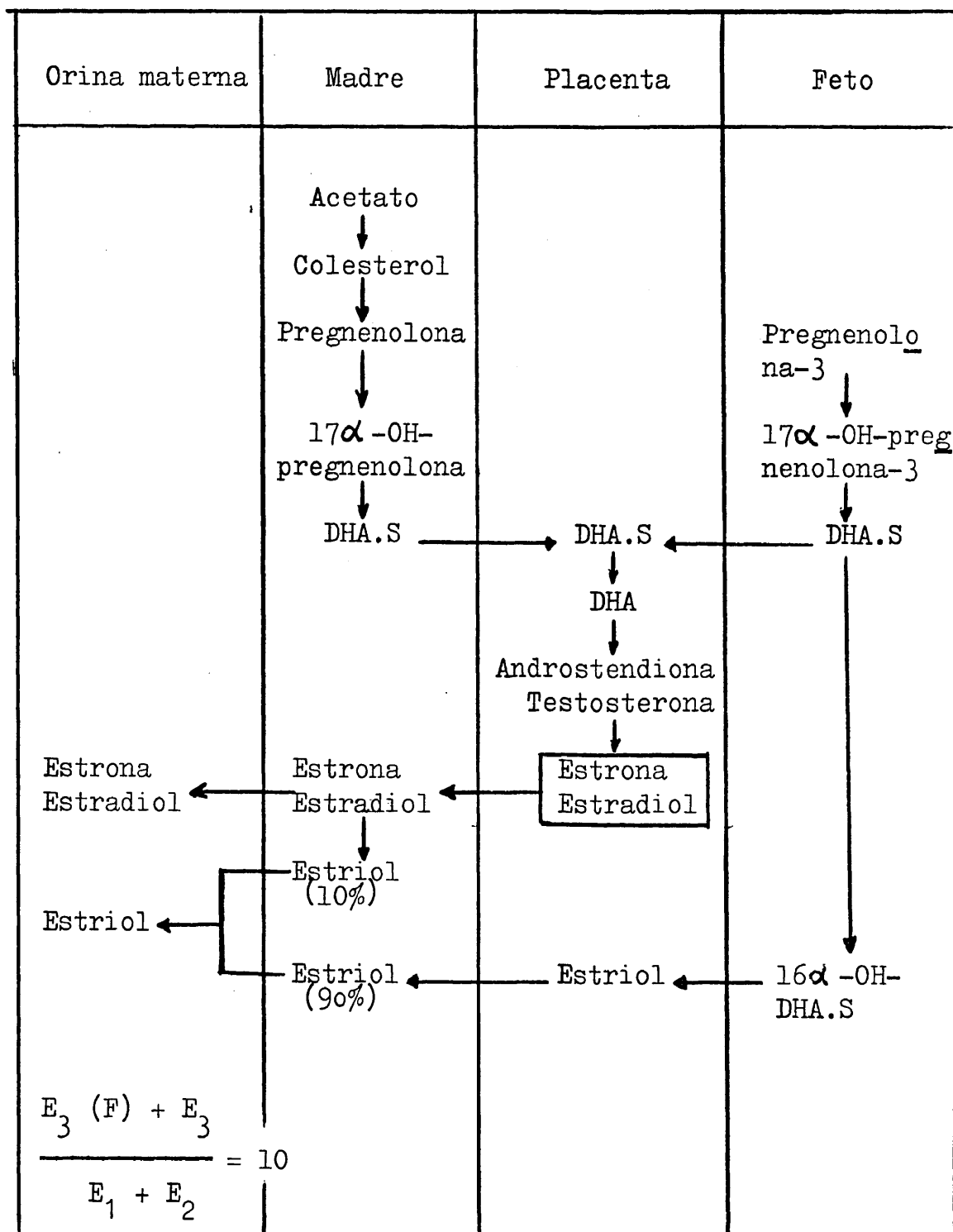
temente en esteroides neutros o fenólicos que estén en forma de 3-sulfatos (88, 89 y 90)

Por lo tanto, podemos concluir que durante una gestación normal, la corteza suprarrenal del feto produce grandes cantidades de 16α -OH-dehidroepiandrosterona-sulfato, que es convertido directamente en estriol por la placenta, según el siguiente esquema. (Esquema C_1 y C_2)

ESQUEMA C_1 PRODUCCION DE ESTROGENOS DURANTE EL CICLO MENSTRUAL



ESQUEMA C₂ ORIGEN DE LOS ESTROGENOS EN LA MUJER GESTANTE



Este estriol, será de origen exclusivamente fetal E_3 (F). Al mismo tiempo el precursor materno -dehidroepiandrosterona-sulfato- y el precursor fetal -también DHA.S- alcanza la placenta y son transformados en estrona y estradiol. Estos estrógenos pasan de la placenta a la circulación materna, donde son sometidos al catabolismo normal de los estrógenos en la mujer, es decir, son parcialmente transformados en estriol. (Fig. 13)

De aquí, que debemos distinguir dos procedencias distintas del estriol secretado durante la gestación: la mayor parte tiene su origen en el feto y se forma en la placenta sin pasar por estrona y estradiol como productos intermedios.

Esto está de acuerdo con Fishman, 1962 (91) y Gúrpide y col., 1962 (92) que en un estudio sobre el catabolismo de los estrógenos en mujeres normales y gestantes, habían llegado a la conclusión de que todo el estriol que se excreta durante el ciclo menstrual procede del metabolismo periférico (en el hígado) de la estrona y estradiol, pero que durante la gestación, sólo una pequeña parte de estriol (aproximadamente una décima parte) deriva de este proceso, mientras que el resto tiene otro origen.

Otra parte, una pequeña cantidad de estriol, se produce en la madre, a través del catabolismo de la estrona y estradiol sintetizados también en la placenta, pero a partir de precursores distintos.

En las gestaciones normales, el estriol es el estrógeno principal y el cociente estriol/estrón + estradiol, como ya hemos visto, tiene valores aproximadamente alrededor de 10. Por el contrario, en gestaciones con molas hidatiformes o gestaciones con fetos anencefálicos, en las que no hay una contribución de precursores fetales para la formación de estrógenos, se da una excreción de estos compuestos mucho más baja, especialmente del estriol, que en este caso deriva exclusivamente del catabolismo en la madre, de la estrón y estradiol. Este origen del estriol explica que el cociente estriol/estrón + estradiol sea, en estos casos, igual a 1. (Tabla III)

TABLA III ESTROGENOS EN LA GESTACION NORMAL Y EN GESTACIONES CON MOLAS HIDATIFORMES

	Producción (mg/24 h)		Excreción (mg/24 h)		$\frac{E_3}{E_1 + E_2}$	
	NP	HMP	NP	HMP	NP	HMP
Estrón	} 6-16	8	2,0	1,8	} 10	1
Estradiol			0,75	0,2		
Estriol			30,0	1,7		

NP : placentas normales

HMP : placentas con molas hidatiformes

1.5 REACCION DE AROMATIZACION EN RELACION CON LA BIOSINTESIS DE LOS ESTROGENOS

Las vias biosintéticas de anillos aromáticos operan en el reino vegetal y en diversos microorganismos. Los animales superiores en condiciones normales, no poseen la capacidad de sintetizar compuestos aromáticos, y para sus necesidades biosintéticas y metabólicas utilizan los residuos aromáticos procedentes de los alimentos ingeridos.

La biosíntesis de las hormonas esteroides y sus derivados constituye el único ejemplo conocido de aromatización en los animales superiores, y transcurre según la reacción indicada en la figura 25.

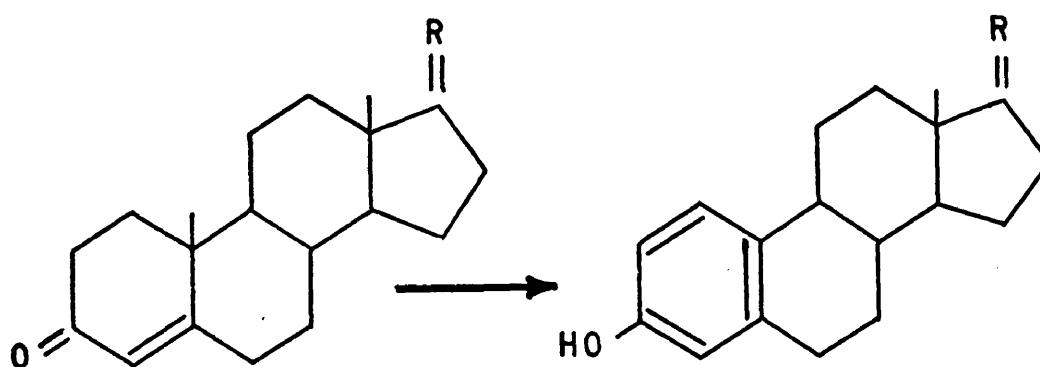


Fig. 25 Aromatización

1.5.1 Vías metabólicas que conducen a la formación de anillos aromáticos en el reino vegetal y en los microorganismos.

En los reinos animal y vegetal abundan extraordinariamente los compuestos que contienen en su molécula uno o más anillos bencénicos.

La síntesis de estos anillos bencénicos procede esencialmente a través de dos vías biosintéticas. La primera se conoce como vía del ácido shikímico y originalmente fue delineada por Davis, 1955 (93) y Sprinson, 1970 (94).

La figura 26 muestra las reacciones y compuestos principales que conducen a la biosíntesis del ácido fenilpirúvico, que da lugar a los aminoácidos aromáticos y a importantes familias de sustancias aromáticas.

La biosíntesis se inicia con una condensación aldólica del ácido fosfoenol-pirúvico con una tetrosa que da lugar a un azúcar de 7 átomos de carbono. Este compuesto sufre una condensación aldólica y se forma ácido dehidroquímico. Por pérdida de agua se forma ácido dehidroshikímico, luego ácido shikímico y finalmente ácido prefénico que se convierte fácilmente en ácido fenil-pirúvico.

La segunda vía metabólica que conduce anillos aromáticos, parte de moléculas de acetato, activadas, que se condensan para formar cadenas poliacéticas. A través de condensaciones aldólicas intramoleculares 1-6 ó 2-7 se forman

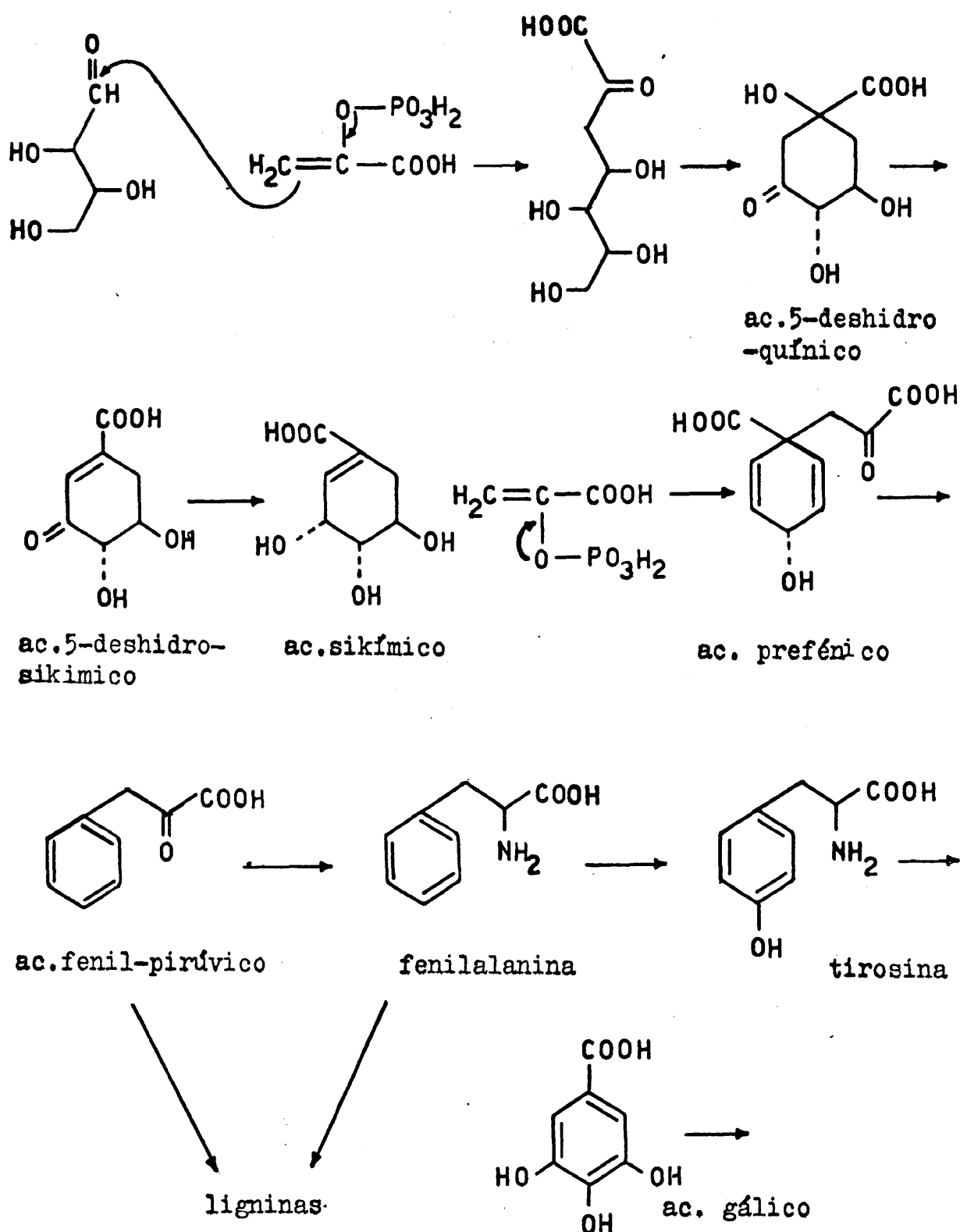


Fig. 26 Vías metabólicas que conducen a la formación de anillos aromáticos

anillos aromáticos del tipo de la floroacetofenona en el primer caso o del ácido orselínico en el segundo.

Estas reacciones están indicadas en la figura 27.

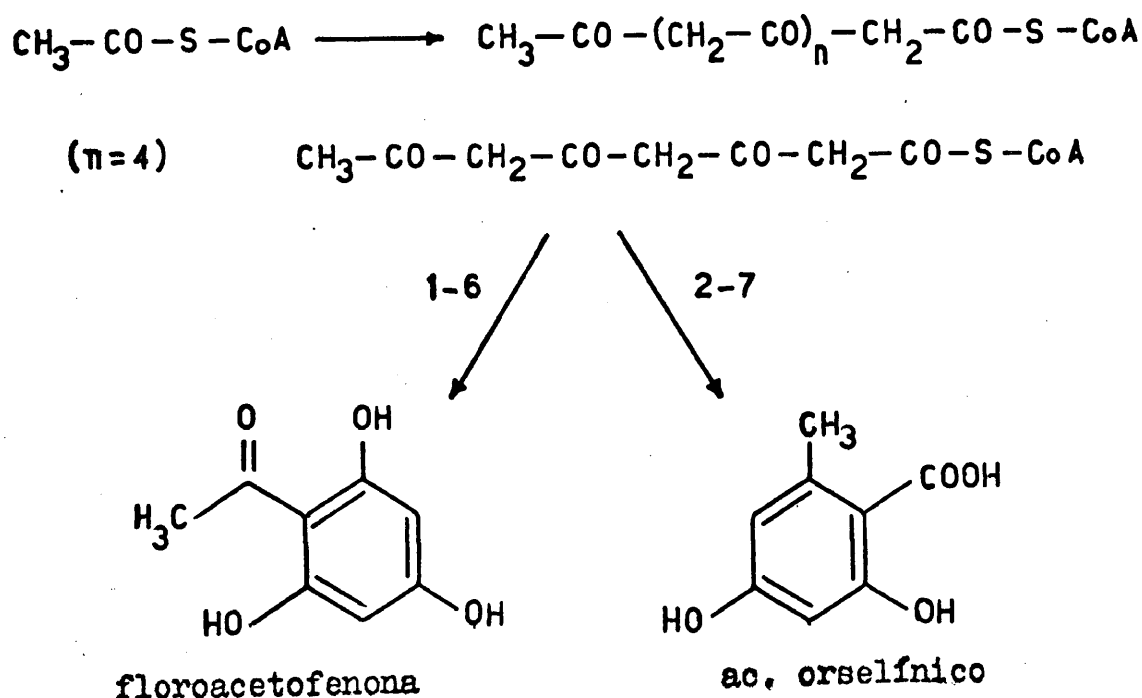


Fig. 27

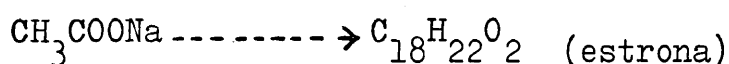
1.5.2 Reacción de aromatización en animales superiores: biosíntesis de hormonas esteroides

Como puede verse, en la biosíntesis de estrógenos, parte de un compuesto de la serie de los androstanos (andrógenos, esteroides con 19 átomos de carbono), y conduce a un compuesto de la serie de los estranos (esteroides con 18 áto

mos de carbono) que poseen un anillo (el anillo A) bencénico y un grupo hidroxilo en posición 3 fenólico.

Los primeros estudios sobre la formación de estrógenos en los animales fueron realizados por Heard y col., 1954 (95). Estos autores inyectaron acetato radioactivo a una yegua gestante y estudiaron los metabolitos urinarios del compuesto radioactivo. Entre ellos pudieron aislar e identificar pequeñas cantidades de estrona radioactiva.

Este experimento constituyó la primera demostración de biosíntesis de un compuesto aromático por parte de un animal a partir de un precursor natural.



En 1863, Lanteman demostró en el hombre que el ácido químico ingerido se transformaba en ácido hipúrico (Fig. 28)

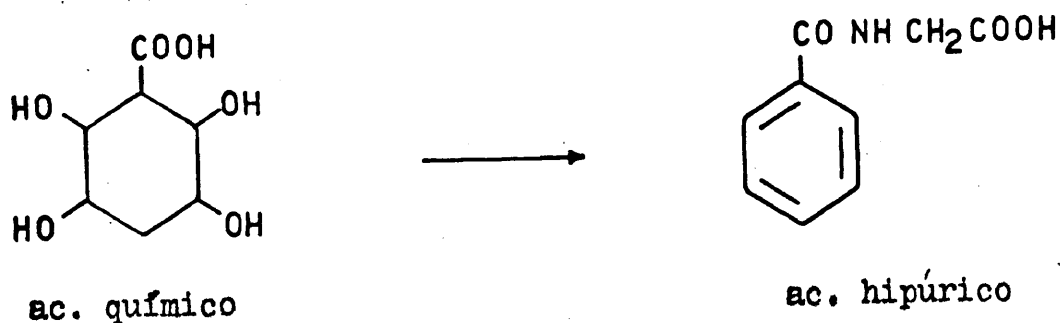


Fig. 28

Estudios más significativos desde el punto de vista del mecanismo del proceso de aromatización en los órganos endocrinos, lo realizaron Baggett y col., 1956 (96). Estos investigadores, mediante estudios "in vitro" consis-

tes en incubaciones de testosterona radioactiva con fragmentos de tejido ovárico, pudieron demostrar que el sustrato radioactivo se había convertido en estradiol. (Fig. 29)

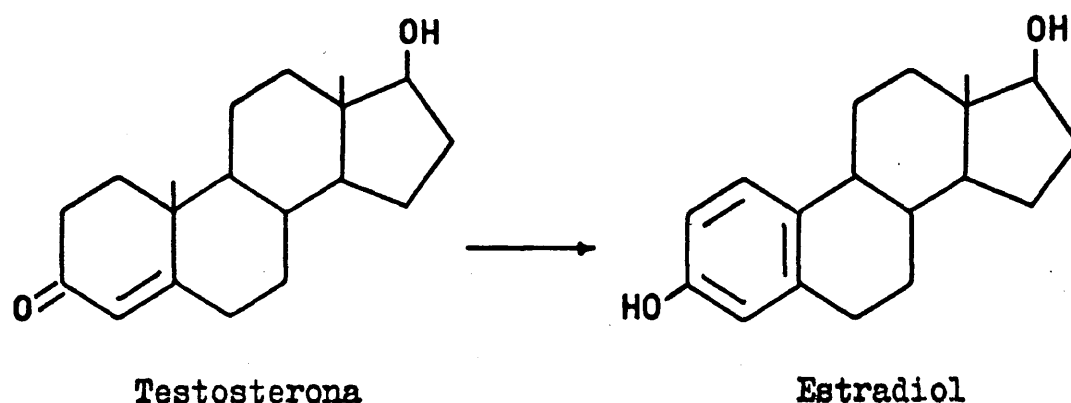


Fig. 29

1.5.3 Mecanismo de aromatización en el paso de andrógenos a estrógenos

Después de este experimento y otros análogos que demostraban que los andrógenos pueden ser transformados (aromatizados) en estrógenos por parte de los tejidos endocrinos, diversos grupos de investigadores se dedicaron a estudiar el mecanismo implicado en este proceso.

Desde el punto de vista estrictamente químico, la conversión de un andrógeno en estrógeno (reacción de aromatización) transcurre con:

- a) la pérdida del metilo angular en la posición 10.
- b) la pérdida de dos átomos de hidrógeno del anillo A.
- c) la enolización del grupo cetónico en posición 3

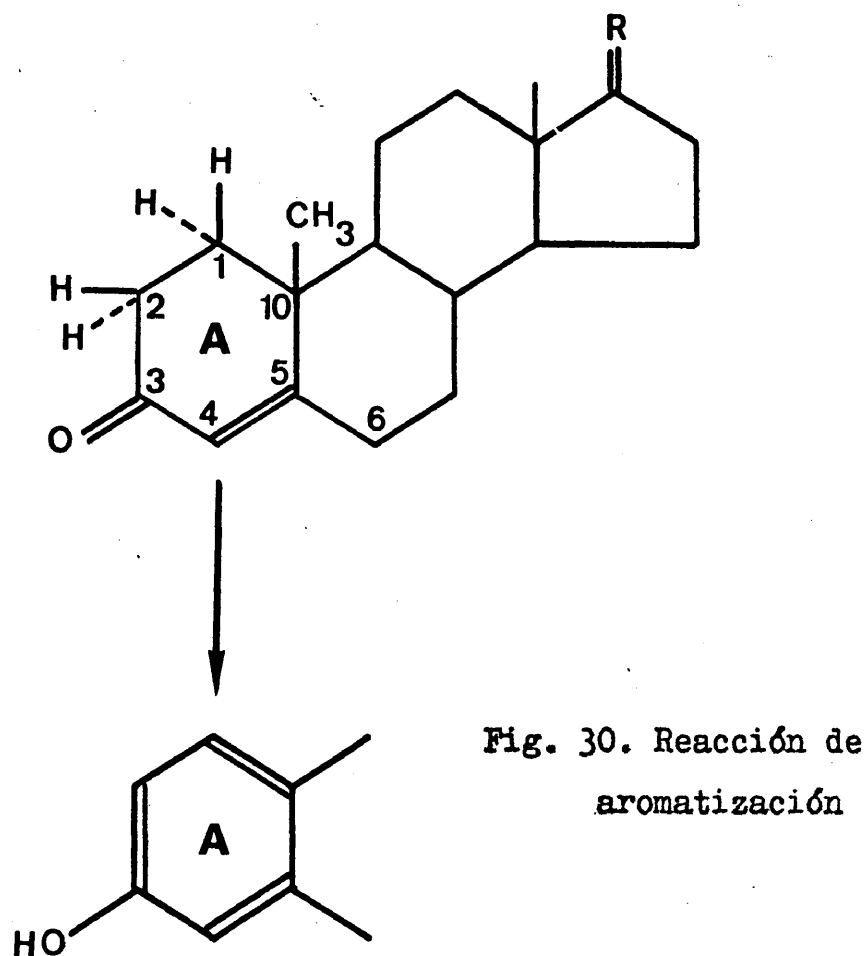


Fig. 30. Reacción de aromatización

En 1955, Meyer (36) realizó dos observaciones importantes en relación con el proceso de la aromatización. La primera es que las glándulas suprarrenales contienen una enzima (19-hidroxilasa), capaz de introducir un grupo hidroxilo en el metilo angular en posición 10, de los esteroides androst-4-en-3,17-diona y dehidroepiandrosterona. La segunda

observación se refiere a la capacidad de la placenta humana, del líquido de los folículos del ovario y de las glándulas suprarrenales bovinas, de transformar el 19-hidroxi-androstendiona en estrona (Fig. 31).

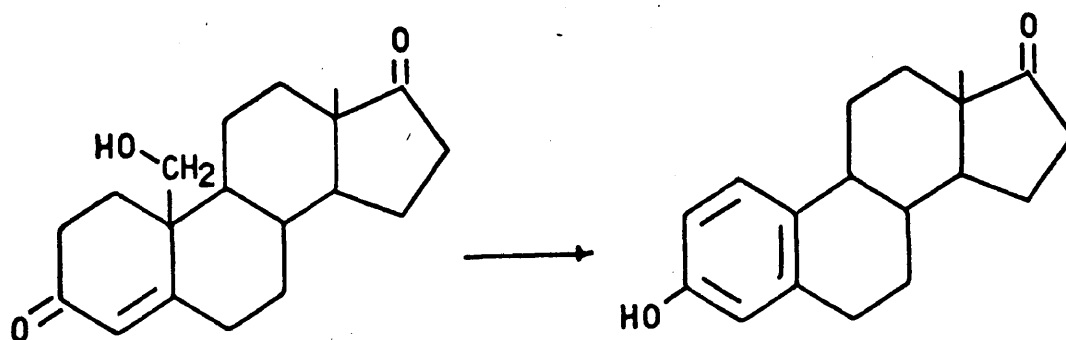


Fig. 31

Ryan, 1959 (82), estudió "in vitro" la reacción de aromatización de diversos andrógenos en tejido íntegro y en fracciones subcelulares de placenta humana, desde el punto de vista de la distribución intracelular de las enzimas y de los cofactores necesarios para la reacción.

Estos estudios demostraron que las enzimas que participan en la conversión de los andrógenos en estrógenos, están localizadas en la fracción microsomial de las células, y que la reacción de aromatización procede sólo en presencia de oxígeno y NADPH.

Estos resultados indicaban como muy probable la participación en el proceso de enzimas del grupo "mixed function oxidases", oxidasas con función intermedia, que son las que catalizan la introducción de grupos alcohólicos según la

siguiente reacción:

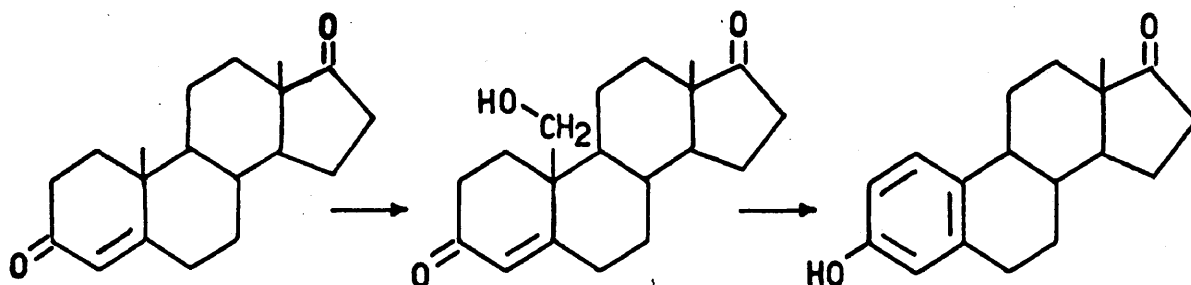


Fig. 32

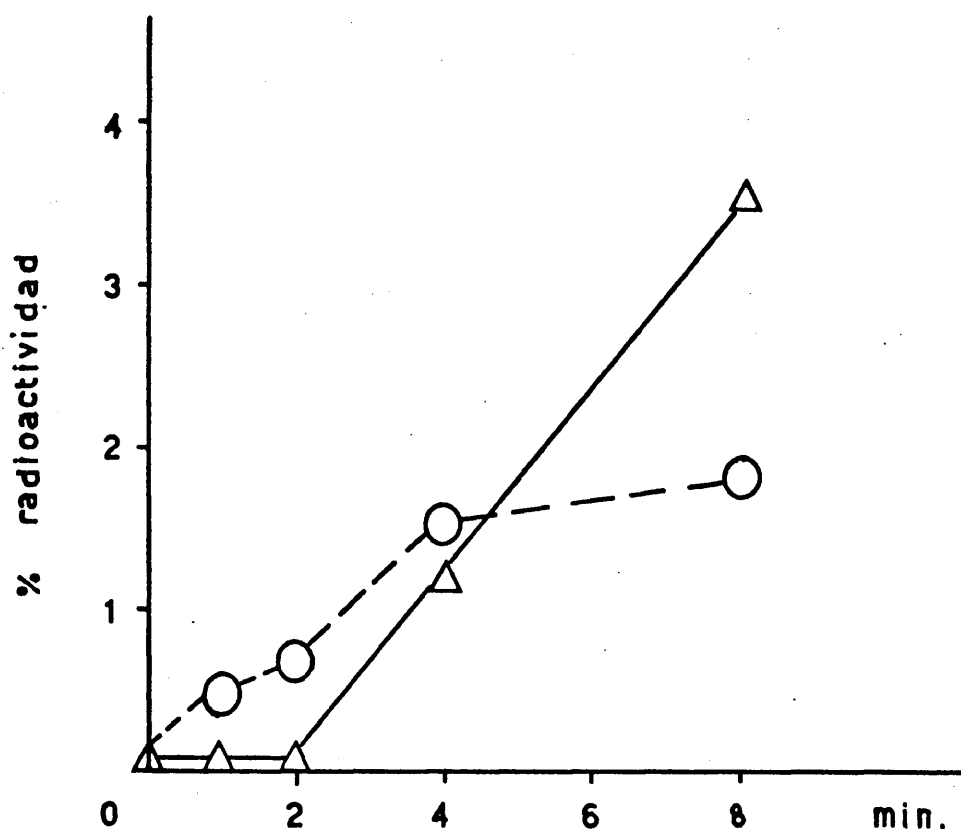
Estos resultados se integraban perfectamente con los precedentes trabajos de Meyer y permitían postular que la 19-hidroxi-androstendiona es un producto intermedio en la aromatización de los andrógenos. (Fig. 32)

1.5.3.1 Pérdida del metilo angular en posición 10

Siendo así que la formación de estrógenos a partir de andrógenos procede con la pérdida de un grupo metilo en 10, la formación de un hidroximetilo permitía explicar la pérdida de este grupo bajo la forma de formaldehído. De modo análogo a lo que ocurre con algunos terpenos, Barton y De Mayo, 1954 (97).

La participación de una 19-hidroxilasa en el proceso de aromatización de los andrógenos, ha sido confirmada primero por el trabajo de Longchamp y col., 1960 (78) que aislaron 19-hidroxi-androstendiona del medio de una incuba-

ción de androstendiona y tejido placentario, y después por los trabajos de Wilcox y Engel, 1964 (98), sobre la cinética de la aromatización de la androstendiona. (Fig. 33)



△ ESTRONA + ESTRADIOL

Fig. 33

○ HIDROXI-ANDROSTENEDIONA

Para explicar la eliminación de un grupo metilo en posición 10 por vía oxidativa pueden considerarse diversos procesos. Teóricamente la eliminación del metilo puede ocurrir que sea a nivel de un hidroximetilo o a nivel de un metil-aldehído o de un grupo carboxílico, formándose respectivamente: H_2CO , $HCOOH$ ó CO_2 (Fig. 34)

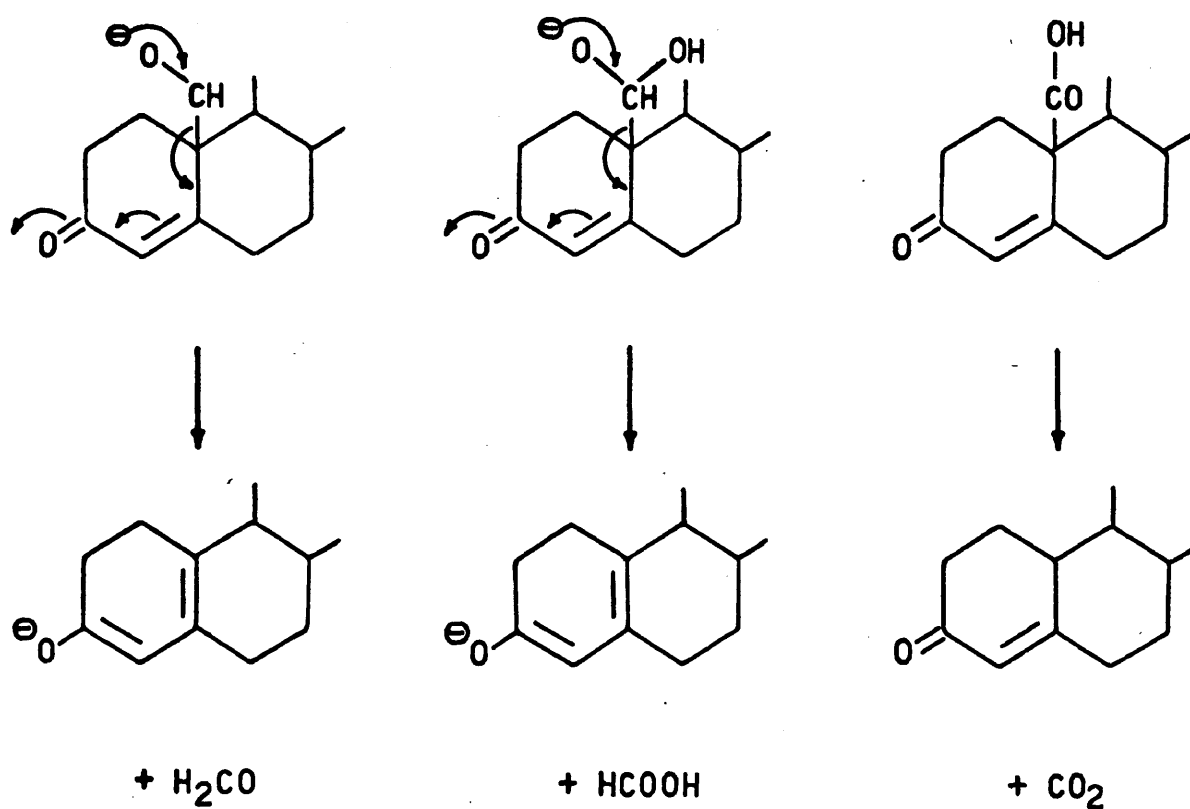


Fig. 34 Eliminación del grupo metilo

1.5.3.2 Pérdida de dos átomos de hidrógeno en el anillo A

Sin embargo en el proceso de la aromatización hay que considerar que junto a un residuo monocarbonoso (metilo), se eliminan también dos átomos de hidrógeno.

El aspecto estereoquímico de la eliminación de es tos dos átomos de hidrógeno ha sido estudiado por Brodie y col., 1968 (99), y sus investigaciones han llevado a la con

clusión de que durante la aromatización se elimina siempre el átomo de hidrógeno situado en la posición 1, mientras que la pérdida del átomo de hidrógeno situado en la posición 2, no es estereoespecífica, siendo probablemente el resultado de la enolización del grupo cetónico en posición 3.

Akhtar y Skinner, 1968 (100) han demostrado que la formación de estrona a partir de 19-hidroxi-androstendiona en incubaciones de tejido placentario, requiere NADPH y O_2 y que durante el proceso se forma 19-aldo-androst-4-en-3,17-diona. (Fig. 35)

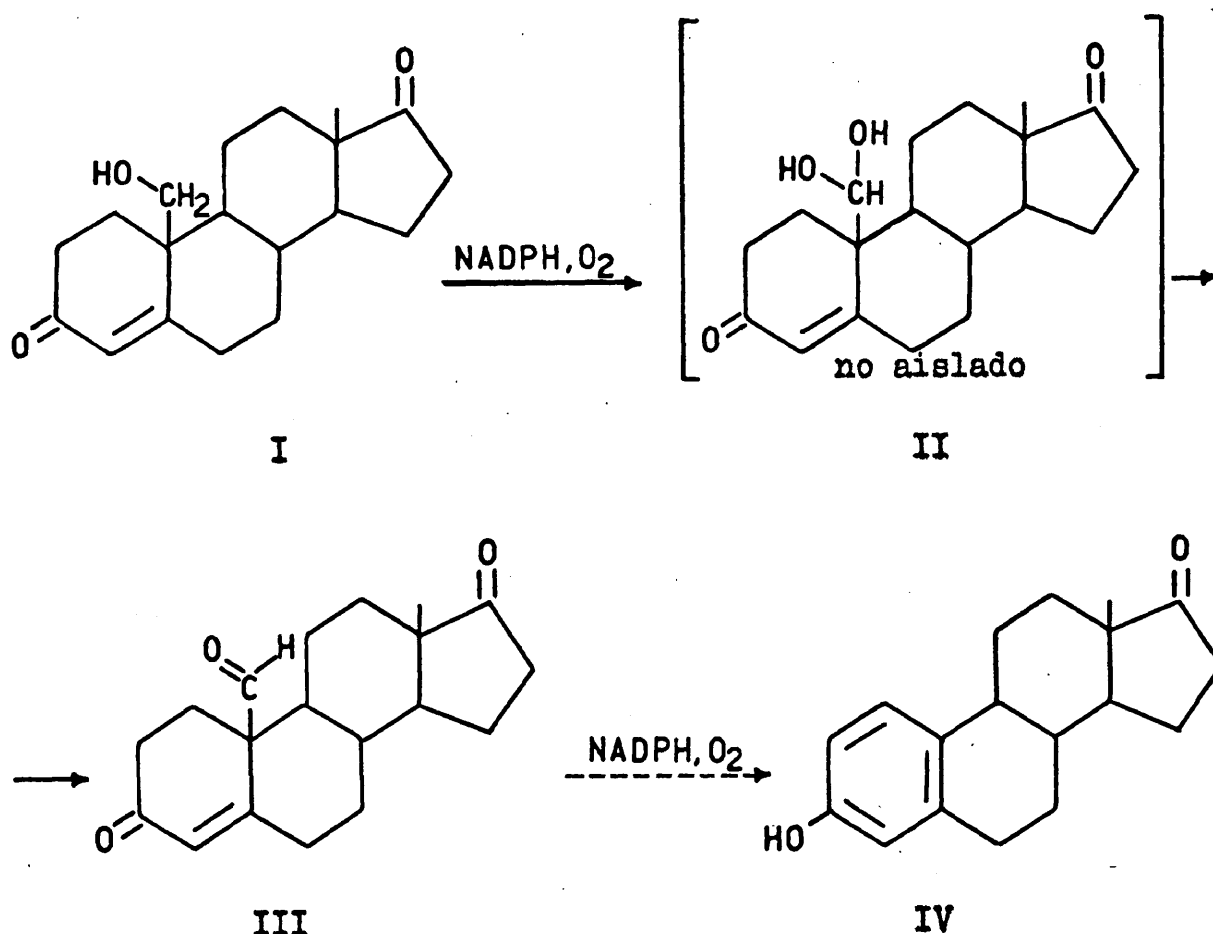


Fig. 35

Akhtar y Skinner, 1968 (100) observaron también que la reacción III - IV procedía más rápidamente en presencia de NADPH y O_2 .

Towsley y Brodie, 1966 (101) han demostrado que el tejido placentario y el tejido ovárico poseen una enzima (la 1β -hidroxilasa) que puede introducir grupos hidroxilos en posición 1β de los 19-nor-esteroides. (Fig. 36)

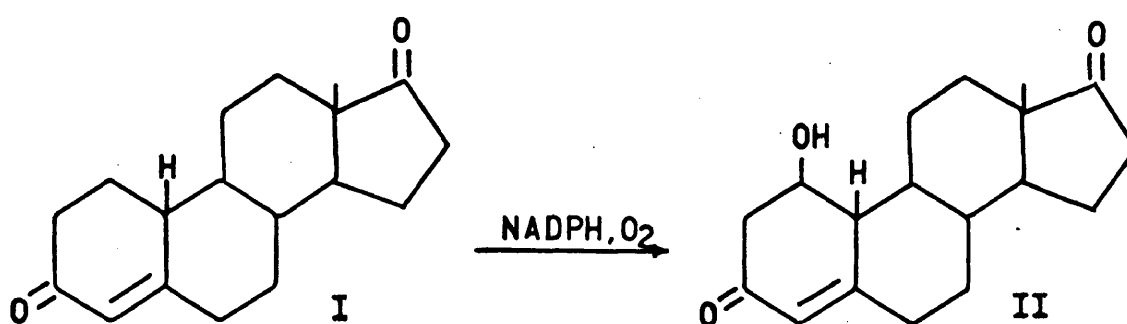


Fig. 36

No ha podido demostrarse la aromatización de II por parte de sistemas biológicos, sin embargo II se convierte fácilmente en estrona en medio ácido o alcalino. (Fig.37)

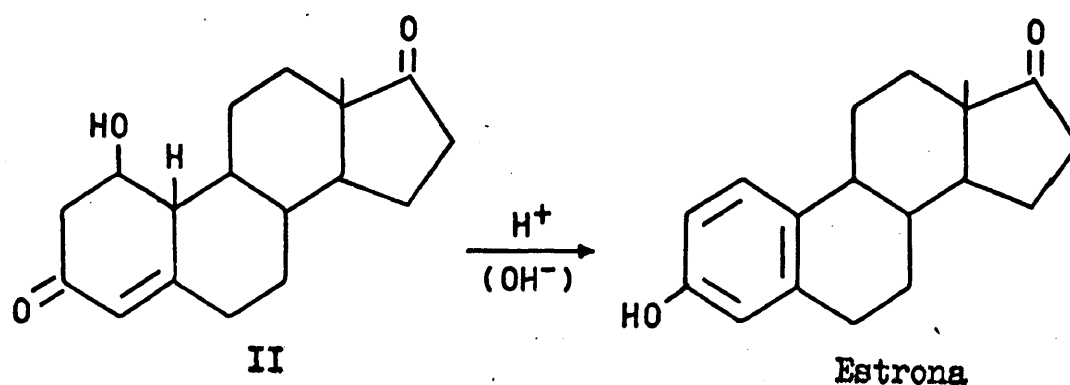


Fig. 37

Estos resultados y el efecto positivo de NADPH y O_2 sobre la aromatización del compuesto intermedio, 19-aldo-androst-4-en-3,17-diona, sugieren la posibilidad de que una hidroxilación en posición 1β puede estar también implicada en el proceso de la aromatización.

1.5.3.3 Enolización del grupo cetónico en 3

Menini, 1971 (102) ha podido evidenciar la formación del compuesto 19-aldo-androst-2,4-dien-3,17 -diol (aislado como diacetato), en incubaciones de testosterona con microsomas placentarios y la conversión espontánea de este compuesto a estradiol diacetato. (Fig. 38)

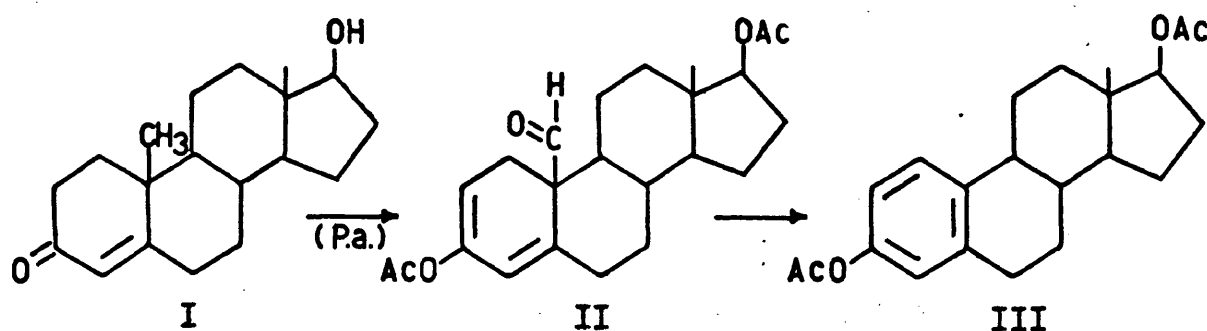


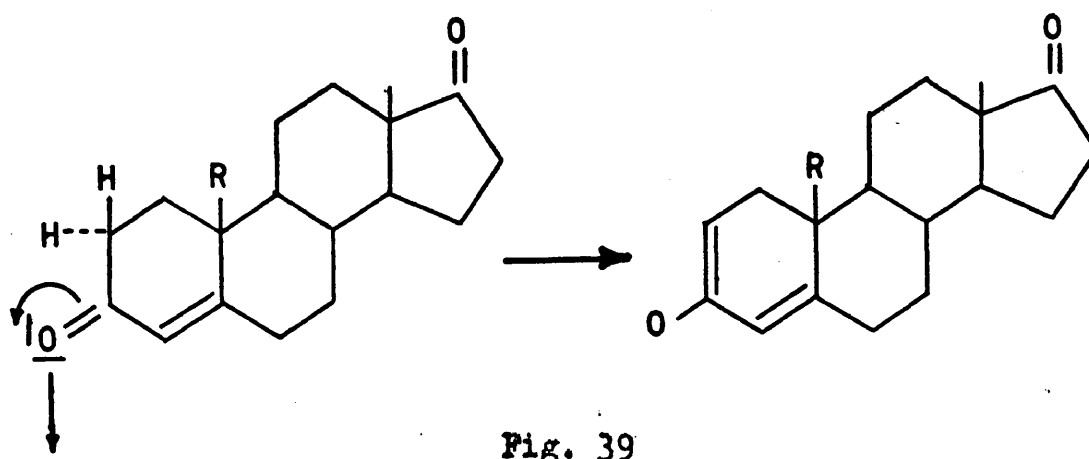
Fig. 38

p.a. = productos acetilados

La reacción II - III no requiere sistemas enzimáticos.

La existencia del compuesto II confirma que la enolización del grupo cetónico en posición 3, es una etapa

singular del proceso de aromatización que probablemente se verifica por acción de una proteína electrofílica. (Fig.39).



De lo expuesta puede concluirse que, según nuestros conocimientos actuales, las fases más significativas del proceso de aromatización de los andrógenos son probablemente las representadas en la figura 40.

El hecho de que Breuer y Grill, 1961, (103) hayan aislado formaldehído como subproducto de la reacción de aromatización en la placenta y que Axelrod y col., 1965 (104), hayan detectado ácido fórmico como subproducto principal, ha ce pensar que la formación de estrógenos en la placenta "in vitro", puede seguir las dos vías iniciadas en la figura 40.

Cabe pensar que factores técnicos relacionados con la preparación del tejido puedan determinar el curso de la reacción según (a) o (b).

Axelrod y col., 1965, (104) han estudiado el des-

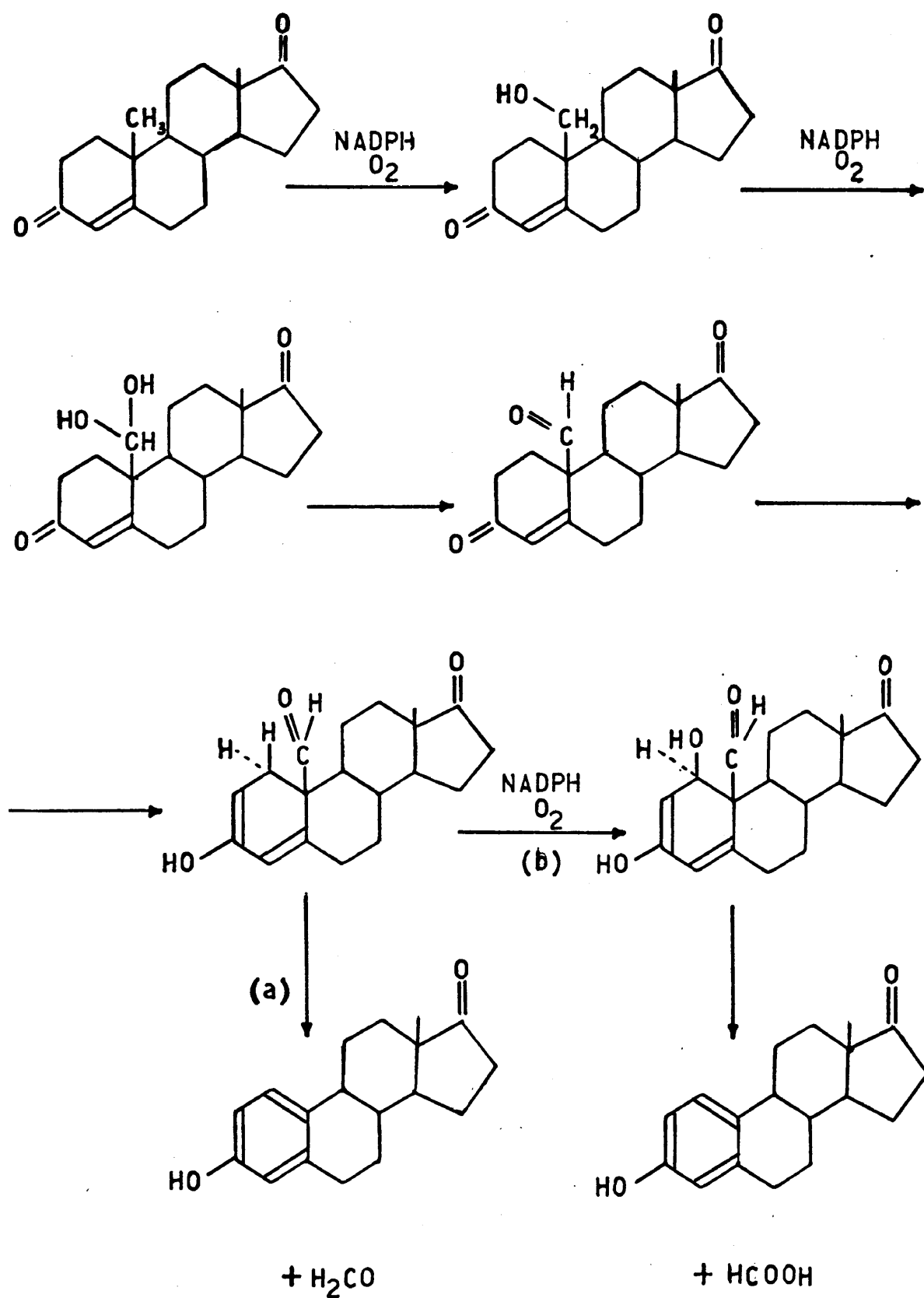


Fig. 40 Aromatización de los andrógenos

tino del átomo de carbono del metilo que se elimina durante la aromatización. Encontraron que en el metabolismo del HCOOH que se había formado, no parecía estar implicado el ácido tetrahidrofólico.

2. PLAN DE TRABAJO

Del estudio de la bibliografía más reciente se deduce que el feto aporta a la placenta dehidro-epiandrosterona sulfato y 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona sulfato para la formación de los estrógenos.

Los procesos que llevan a la producción de estrógenos en la placenta a partir de precursores fetales, implican la intervención de un gran número de enzimas:

esterol-sulfato sulfohidrolasa	3.1.6.2
3 (δ 17) β -hidroxiesteroide: NAD(P) oxidoreductasa	1.1.1.51
3-cetosteroide Δ^4 - Δ^5 -isomerasa	5.3.3.1
esteroidel9-hidroxilasa	1.4.1
esteroidel9-hidro-liasa?	4.2.1
esteroide3-ceto-enol-isomerasa?	5.3.2
esteroide 19-aldehido-liasa?	4.1.2

Todas estas enzimas están localizadas en la fracción microsomial de la célula (Ryan, 1959; Warren and French, 1965; Hagerman, 1969) excepto el 17β -ol-dehidrogenasa que es más abundante en la parte soluble. La mayor parte de los procesos que conducen a la aromatización requieren O_2 y NADPH. Ryan, 1959, y más recientemente Akhtar y Skinner, 1968, han individualizado los pasos que dependen de estos cofactores.

Hoy se acepta comunmente que la excreción de estrógenos a través de la orina materna, en un gran número de casos, refleja las condiciones de desarrollo del feto; precisamente por ser éste la fuente principal de los esteroides precursores de los estrógenos.

De todo ello se deduce que pueden ser dos las causas por las que se de, en un caso determinado, una baja excreción de estrógenos:

- una baja producción de los esteroides precursores por parte del feto.
- una baja capacidad de aromatización de estos compuestos por parte de los sistemas enzimáticos de la placenta.

De aquí partió nuestro intento de interpretar las deficiencias metabólicas a través de un estudio "in vitro" de la reacción de aromatización con tejido proveniente de placentas normales y patológicas.

En primer lugar nos propusimos establecer unos parámetros hormonales medios, para placentas normales, a los cuales poder referir los obtenidos en casos de placentas patológicas.

Dada la gran variabilidad observada en la capacidad aromatizante de unas placentas con respecto a otras, pareció oportuno estudiar un número de placentas tal que nos permitiera obtener valores significativos.

Con el fin de valorar de algún modo la causa, o

quizás las causas, de una baja excreción de estriol, se hizo un estudio conjunto de la actividad aromatizante y de la actividad sulfatásica de un grupo de placentas en las que se daba una baja concentración urinaria de estrógenos durante el embarazo.

Con todo esto teníamos una visión global del problema. Pero nos interesaba además, profundizar en el estudio bioquímico de la reacción de aromatización para descubrir la secuencia de las reacciones implicadas en la conversión de un esteroide precursor (16α -OH-esteroide) en estrógenos. Con este fin, se hizo el estudio cinético de la reacción de conversión de 16α -OH-esteroides en estriol.

La línea fundamental del trabajo anteriormente esbozado, ha planteado cuestiones accesorias, exigidas como trabajo preliminar, o bien derivadas de él, abriéndose a nuevos horizontes en la interpretación del problema.

Entre las primeras, se encuentra el estudio de las condiciones optimales para realizar la reacción de aromatización "in vitro".

Entre las segundas, un amplio estudio acerca de los métodos de determinación de los 16α -OH-esteroides. Este estudio que constituye un capítulo adicional en el apartado de Métodos, es sin embargo, de enorme interés para futuras investigaciones.

3. M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

3.1 PRODUCTOS

Los productos y las casas donde han sido adquiridos pueden verse a continuación:

MERCK

Acido bórico
Acido clorhídrico 37%
Acido sulfúrico 96-98%
Agua oxigenada 30%
Anhídrido acético
Eter
Gel de sílice GF₂₅₄
Sacarosa

CARLO ERBA

Acetato de etilo
Acetona
Benceno
Bicarbonato sódico
Ciclohexano
Cloruro sódico
Dicromato potásico
Dimetil diclorosilano

Etanol

Fosfatos

Hexametil disilazano

Hidróxido sódico

Metanol

Tolueno

Trimetil clorosilano

BDH chemicals

Bencil-trimetil-amonio

Celita₅₄₅

Cloroformo

Dimetil sulfato

Hidroquinona

m - dinitro benceno

Piridina

BOEHRINGER

Glucosa-6 fosfato

NADP

NADPH

Nicotinamida

MALLINCKRODT chemical works

Acido silícico

APPLIED SCIENCE LABORATORIES

Gas Chrom. Q.

PACKARD

Permafluor

IKapharm

Esteroides que se mencionan
en la pág. 84

ESTEROIDES CITADOS EN ESTE TRABAJO

<u>Nombre común</u>	<u>Nombre químico sistemático</u>
ALDOSTERONA	11 β , 21-dihidroxi-3, 20-dioxopregn-4-en-18-al
ANDROSTENDIOL	androst-5-eno-3 β -17 β -diol
ANDROSTENDIONA	androst-4-eno-3, 17-diona
16 α -HIDROXI-ANDROSTENDIONA	16 α -hidroxiandrost-4-eno-3, 17-diona
19-HIDROXI-ANDROSTENDIONA	19-hidroxiandrost-4-eno-3, 17-diona
ANDROSTENTRIOL	androst-5-eno-3 β , 16 α , 17 β -triol
COLESTEROL	colest-5-en-3 β -ol
CORTICOSTERONA	11 β , 21-dihidroxi-4-eno-3, 20-diona
CORTISOL	11 β , 17 α , 21-trihidroxi-4-eno-3, 20-diona
DEHIDRO-EPIANDROSTERONA	3 β -hidroxiandrost-5-en-17-ona
16 α -HIDROXI- DEHIDROEPIANDROSTERONA	3 β , 16 α -dihidroxiandrost-5-en-17-ona
19-HIDROXI- DEHIDROEPIANDROSTERONA	3 β -19-dihidroxiandrost-5-en-17-ona
ESTRADIOL	estro-1, 3, 5 (10)-trien-3, 17 β -diol
ESTRIOL	estrâ-1, 3, 5 (10)-trieno-3, 16 α , 17 β -triol
ESTRONA	3-hidroxiestro-1, 3, 5 (10)-trien-17-ona
PREGNANDIOL	5 β -pregnano-3 α , 20 α -diol
PREGNENOLONA	3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona
PROGESTERONA	pregn-4-eno-3, 20-diona
TESTOSTERONA	17 β -hidroxiandrost-4-en-3-ona
16 α -HIDROXI-TESTOSTERONA	16 α , 17 β -dihidroxiandrost-4-en-3-ona
19-HIDROXI-TESTOSTERONA	17 β , 19-hidroxiandrost-4-en-3-ona

3.2 REACTIVOS Y DISOLVENTES: PURIFICACION

ACETATO DE ETILO (p.e. 77°C). Primero se hierve a reflujo durante una hora añadiendo por cada litro 20 ó 30 gramos de carbonato potásico. Se deja depositar el carbonato y se pasa a otro balón para destilar. Después se destila con refrigerante de Liebig.

ANHIDRIDO ACETICO. Se destila con refrigerante de Liebig unido a un termómetro, y se tiene cuidado de recoger el producto destilado a una temperatura comprendida entre 136° - 138°C .

CLOROFORMO (p.e. 61°C). Se hierve primero a reflujo durante una o dos horas añadiendo por cada litro 20 ó 30 gramos de carbonato potásico. Después se destila en columna de fraccionamiento o en refrigerante Liebig.

ETANOL (p.e. 78°C). Hierve a reflujo durante 2 ó 3 horas y se añade por cada litro 5 gr de 2-4 nitrofenil-hidracina y 10 ml de ácido clorhídrico concentrado. Se destila después lentamente en columna de fraccionamiento.

PIRIDINA (p.e. 114° - 116°C). Primero hervir a reflujo durante tres horas añadiendo por cada litro 20 ó 30 gr de

hidróxido potásico. Destilar con refrigerante de Liebig teniendo cuidado de añadir hidróxido potásico cuando ya se ha recogido un poco de destilado.

ACETONA (p.e.56,2°C)

ACIDO ACETICO (p.e.118°C)

BENCENO (p.e.80°C)

DICLOROMETANO (p.e.39°-41°C)

ETER ETILICO (p.e.38°C)

ETER DE PETROLEO (p.e.40°-70°C)

HEXANO (p.e.68,7°C)

METANOL (p.e.65°C)

TOLUENO (p.e.110,6°C)

Todos los de este último grupo tienen una destilación normal con refrigerador de Liebig.

3.3 TECNICAS DE PURIFICACION DE LOS 16α -OH-ESTEROIDES

El estudio que se presenta a continuación pretende abordar el problema de la purificación y separación de un grupo de 16α -hidroxi-esteroides (Tabla IV), precursores o compuestos intermedios en las vías metabólicas para la formación de estriol en la unidad feto-placentaria.

TABLA IV

16α -OH- E_1	16α -hidroxi-estrona
E_3	estriol
Δ^5 - A_3	Δ^5 -androstentriol
16α -OH-A	16α -hidroxi-androstendiona
16α -OH-T	16α -hidroxi-testosterona
16α -OH-DHA	16α -hidroxi-epiandrosterona

los nombres sistemáticos se pueden ver en la pág. 84

3.3.1 Cromatografía sobre capa fina

Se ha utilizado la cromatografía en capa fina por que ofrece la posibilidad de ensayar en poco tiempo un gran número de disolventes y probar así, en cuál de ellos se obtiene una separación más conveniente.

Para la preparación de las placas de cromatografía se extiende sobre una superficie de vidrio de 20 x 20 cm una capa de espesor uniforme -0,2 mm aproximadamente- de gel de sílice GF₂₅₄ preparada previamente mezclando una cantidad de gel de sílice con doble de agua y agitando fuertemente durante 1-2 min. Se utilizó un Estratificador automático modelo "Stratomat" de la Chemetron-Milán.

Las placas así preparadas se dejan secar primero a temperatura ambiente y luego, en estufa a 110°C durante 2 horas, para activarlas.

En algunos casos se han utilizado placas de la casa MERCK. Los resultados han sido semejantes. Las placas cromatográficas preparadas comercialmente necesitan mayor tiempo de desarrollo.

Sobre estas placas se aplican 10 μ g aproximadamente de cada uno de los esteroides antes mencionados. (Tabla IV)

Para el desarrollo de las placas se han hecho pruebas con diversos sistemas de disolventes. La Tabla V muestra los 10 sistemas de desarrollo que se han utilizado

para la separación de estos esteroides.

TABLA V DISOLVENTES DE DESARROLLO PARA ANALISIS CROMATO-
GRAFICOS SOBRE CAPA FINA DE 16 α -OH-ESTEROIDES
EN FORMA LIBRE

I	Ciclohexano - Acetato de etilo (1:1)
II	Benceno - Acetato de etilo (1:1)
III	Cloroformo - Metanol- agua (90:10:1)
IV	Benceno - Eter (1:1)
V	Cloroformo - Acetona (1:1)
VI	Cloroformo - Acetona (1:2)
VIIa	Benceno - Acetato de etilo (1:3) 1 desarrollo
VIIb	Benceno - Acetato de etilo (1:3) 2 desarrollos
VIII	Benceno - Eter (45:70)
IX	Benceno - Eter - Acetato de etilo (45:70:1)
X	Cloroformo - Etanol (9:1)

La Tabla VI muestra los cinco sistemas de desarrollo utilizados para la separación de estos esteroides como derivados acetilados y como trimetilsilileteres.

TABLA VI DISOLVENTES DE DESARROLLO PARA ANALISIS CROMATO-
GRAFICO DE 16 α -OH-ESTEROIDES DERIVADOS

XI	Ciclohexano-Acetona (7:3)	} Acetatos
XII	Eter - Benceno (1:1)	
XIII	Acetato de etilo - Benceno (1:4)	
XIV	Ciclohexano - Acetona (3:1)	
XV	Benceno	- TMSi

Las placas, una vez desarrolladas, se observan bajo una lámpara de luz ultravioleta, con lo que se evidencian los compuestos que poseen un grupo cetónico conjugado con un doble enlace en α, β , o sea, la 16 α -OH-androstendiona y la 16 α -OH-testosterona.

En un segundo momento se rocía la placa con una solución al 0,01% (P/V) de dicromato potásico en ácido sulfúrico concentrado o etanol -ácido sulfúrico (1:1,V/V)- y se calienta en estufa a 110°C. Así aparecen coloreados todos los demás de forma característica.

En las Tablas VII y VIII pueden verse los valores R_F obtenidos para cada esteroide en cada uno de los casos.

TABLA VII. VALORES R_F OBTENIDOS EN CROMATOGRAFIA SOBRE CAPA FINA CON LOS DISOLVENTES DE LA TABLA VI

	XI	XII	XIII	XIV	XV
16 E ₁	0,41	0,84	0,66	0,35	
E ₃	0,49	0,84	0,65	0,43	0,18
$\Delta^5 A_3$	0,62	0,84	0,65	0,60	0,75
16 A	0,25	0,40	0,17	0,20	0
16 T	0,33	0,49	0,27	0,26	0,04
16 DHA	0,54	0,84	0,72	0,50	0,29

TABLA VIII CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA CON LOS DISOLVENTES DE LA TABLA V

	I	II	III	IV	V	VI	VIIa	VIIb	VIII	IX	X
1		0,69	0,83		0,90		0,82		0,53	0,70	0,80
2	0,10	0,15	0,40	0,02	0,54	0,40	0,29	0,44			0,35
3	0,07	0,09	0,42		0,37		0,16	0,31			0,31
4		0,40	0,92	0,21	0,90		0,59		0,25	0,33	0,86
5		0,08	0,61	0,02	0,52		0,15	0,25			0,41
6	0,36	0,43	0,88	0,26	0,83	0,59	0,63		0,29	0,38	0,74

1.- 16α -hidroxi-estrona

2.- estriol

3.- Δ^5 -androstentriol

4.- 16α -hidroxi-androstendriona

5.- 16α -hidroxi-testosterona

6.- 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona

3.3.2 Cromatografía en columna

Se ha probado la cromatografía en columna para separar el colesterol del grupo de los 16α -OH-esteroides. El colesterol se encuentra en grandes cantidades en el tejido placentario y tiene un tiempo de retención en cromatograffia gas-líquido que puede interferir con los esteroides que nos interesa determinar. Por eso es interesante eliminarlo previamente.

También puede ser útil este procedimiento para purificar los esteroides separándolos de otras sustancias que no interesan.

En algunos casos, se usa la cromatografía en columna para una primera separación de estos esteroides entre sí, que facilite la ulterior separación en cromatografía gas-líquido.

3.3.2.1 Columna de alúmina

Se usaron columnas de vidrio de 1cm de diámetro interno, que tienen en la parte superior un embudo de 25 cc y en la inferior una llave reguladora de la caída del líquido

En este caso se utilizó como material de adsorción alúmina (act.II-III) desactivada con 6,5% de agua.

Para preparar la columna se pone un poco de algodón previamente lavado, un poco de cuarzo y una suspensión

homogénea de la alúmina en benceno. Se deja sedimentar y se pone de nuevo un poco de cuarzo para evitar el que la alúmina se remueva.

Los esteroides disueltos en 5 ml de benceno se pasan por la columna donde quedan retenidos. A continuación se pasan distintos eluyentes que van separando los esteroides en distintas fracciones, que recogemos en tubos.

Las distintas fracciones se analizan por medio de cromatografía sobre capa fina (3.3.1).

La Tabla IX muestra los tres sistemas de eluyentes utilizados.

TABLA IX

Sist.	Frac.	Eluyentes
A	a ₁	15 ml benceno
	a ₂	15 ml 2,5% etanol/benceno
	a ₃	15 ml 5% etanol/benceno
B	b ₁	15 ml benceno
	b ₂	15 ml 4% etanol/benceno
	b ₃	15 ml 8% etanol/benceno
C	c ₁	15 ml benceno
	c ₂	15 ml 4% etanol/benceno
	c ₃	10 ml 15% etanol/benceno
	c ₄	10 ml 10% etanol/benceno

En todos los casos se pasa un último eluyente más polar para comprobar que en la columna no queda ningún resto de esteroides.

Las Tablas X, XI y XII muestran la separación de los esteroides obtenida en cada uno de los casos.

TABLA X

A		
a_1	a_2	a_3
colesterol (+++)	$16\alpha\text{-OH-E}_1$ (++) $16\alpha\text{-OH-DHA}$ (++) $16\alpha\text{-OH-}\Delta^4\text{A}$ (+++)	$16\alpha\text{-OH-E}_1$ (+) $16\alpha\text{-OH-DHA}$ (+) $16\alpha\text{-OH-T}$ (+++)

TABLA XI

B		
b_1	b_2	b_3
colesterol (+++)	$16\alpha\text{-OH-E}_1$ (+++) $16\alpha\text{-OH-DHA}$ (+++) $16\alpha\text{-OH-}\Delta^4\text{A}$ (+++) $16\alpha\text{-OH-T}$ (++)	$16\alpha\text{-OH-T}$ (++)

El E_3 y $\Delta^5\text{A}_3$ no se recuperan

TABLA XLI

C			
c ₁	c ₂	c ₃	c ₄
colesterol (todo)	16 α -OH-A (todo)		
	16 α -OH-E ₁ (todo)	16 α -OH-E ₁ (+)	
	16 α -OH-D (+++)	16 α -OH-D (+)	
		16 α -OH-T (++)	16 α -OH-T (++)
			E ₃ (++)
			Δ^5 A ₃ (++)

3.3.2.2 Columna de ácido silícico + celita

Se utilizaron columnas de vidrio como las descritas en el apartado 3.3.2.1

El material de adsorción en este caso está formado por una mezcla al 50% de ácido silícico (UNISIL) desactivado con 5% de agua y celita previamente lavada. La celita favorece la rapidez de elución de la columna. En la columna se ponen 4 gr aproximadamente de la mezcla.

El lavado de la celita consiste en tratarla va-

rias veces con ácido ClH. Después de dejarla reposar durante una hora, se decanta el ClH, y la celita se lava repetidas veces con agua, hasta que alcance un pH neutro. Llegado este momento se trata con metanol, dejándola secar primero a temperatura ambiente, y luego en estufa a 100°C.

Los eluyentes utilizados en este caso fueron los de la Tabla XIII.

TABLA XIII

D	d ₁	30 ml 2% acetato de etilo/benceno
	d ₂	30 ml 30% acetato de etilo/benceno
	d ₃	30 ml 10% etanol/acetato de etilo

Se recogieron las distintas fracciones y se analizaron en cromatografía sobre capa fina, desarrollándolas en un sistema benceno/éter (1:1) y verificándolas a la luz ultravioleta o con tratamiento de una solución de dicromato potásico en ácido sulfúrico concentrado, y poniéndolo en estufa a 110°C.

La Tabla XIV muestra la separación obtenida.

TABLA XIV

D		
d_1	d_2	d_3
colesterol (+++)	16α -OH-DHA (+)	16α -OH-DHA (++) 16α -OH- Δ^4 A (++) E_3 (+++) 16α -OH-T (+++)

3.4 DETERMINACION DE LOS 16α -OH-ESTEROIDES MEDIANTE CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

La determinación cuantitativa de los 16α -OH-esteroides (pág. 84) se hizo mediante cromatografía gas-líquido. Se utilizó para ello un gas-cromatógrafo Pye, Mod. 104, con detector a llama de hidrógeno, en el que se ensayaron los distintos tipos de columna que a continuación señalamos: Tabla XV.

TABLA XV COLUMNAS PARA CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

OV - 1	metil-silicona
QF - 1	trifluoro-propil-silicona
OV - 17	50% fenil- 50% metil-silicona
XE - 60	ciano-etil-silicona
OV - 25	75% fenil- 25% metil-silicona
OV - 61	33% fenil- 67% metil-silicona

3.4.1 Preparación de las columnas

Se utilizaron columnas de vidrio de 5 mm de diámetro interno y 150-200 cm de longitud, enrolladas varias veces en espiral.

Como material de soporte se ha utilizado gas-Chrom Q. (Applied Science Labs.), que es una tierra de diatomeas inerte, de 100-120 mesh.

3.4.1.1 Silanización

La columna, el dispositivo de vidrio para introducir las muestras y la lana de vidrio, se silanizan antes de proceder al relleno de la columna. Se sumergen en una solución al 5% de dimetil-diclorosilano en tolueno. Después se lava: primero con tolueno y finalmente con metanol. Se seca en estufa a 100-120°C.

3.4.1.2 Distribución de la fase estacionaria sobre el material de soporte

Una parte del material silanizado se sumerge en 5 volúmenes de una solución al 1% (P/V) de la fase estacionaria en tolueno. Al preparar esta solución se añade, en general, el 10-20 % de acetona para favorecer una buena disolución. En algunos casos de mayor dificultad, conviene, además, calentarlo a baño-maría.

La "papilla" así obtenida, se agita durante 5-15

minutos y se le aplica vacío suavemente durante otros 10-15 min. para extraer el aire.

El preparado se filtra con papel en un embudo Buchner, para eliminar la mayor parte del líquido. Al final de esta operación se hace el máximo vacío y se comprime el sólido con un "beaker". Luego se extiende sobre papel de filtro durante dos horas, removiendo frecuentemente con una varilla de vidrio, especialmente cuando el material de relleno está todavía impregnado por el tolueno. Al final de esta operación se deja toda la noche en un desecador a 110°C.

Obtenemos así una concentración aproximada de 1% de fase estacionaria en el material de soporte.

3.4.1.3 Relleno de la columna y pre-calentamiento

Se introduce primero un poco de lana de vidrio bien apretada. A continuación se aplica vacío suavemente. Cuando se han llenado aproximadamente unos 10cm se aplica el vacío máximo.

La columna se rellena poniendo pequeñas cantidades (0,2-0,3 gr) del material preparado y golpeando el vidrio ligeramente con un trozo de tubo de goma dura, hasta que nos aseguramos que el material dentro de la columna es lo más compacto posible.

Se lleva hasta una distancia del final de la columna de 7 u 8 centímetros. Se cubre con otro poco de lana de vidrio.

Después del empaquetamiento, la columna se calienta durante 24 o más horas a 240-260°C (según la estabilidad de la fase estacionaria) haciendo pasar a través de ella nitrógeno.

La columna no debe estar conectada con el detector mientras pasa el nitrógeno.

Se deja después enfriar sin quitar la corriente de azoto. Así queda preparada para el uso. Siempre que la columna queda colocada dentro de la cámara de calentamiento debe mantenerse en funcionamiento la corriente de nitrógeno.

3.4.2 Formación de derivados

Para analizar estos 16 α -OH-esteroides mediante cromatografía gas-líquido, es necesario formar previamente derivados acetilados o trimetilsililéteres, ya que se ha visto que estos compuesto analizados como libres se descomponen fácilmente al pasar por la columna.

En la figura 41 puede verse uno de estos ejemplos: analizando la 16 α -OH-T en una columna 1% OV-1:210°C (Tabla XV), se obtuvo un cromatograma en el que puede observarse la aparición de innumerables picos no significativos, mientras que este mismo esteroide, analizado en la misma columna, como di-acetato, permaneció inalterado y se obtuvo un único pico característico.

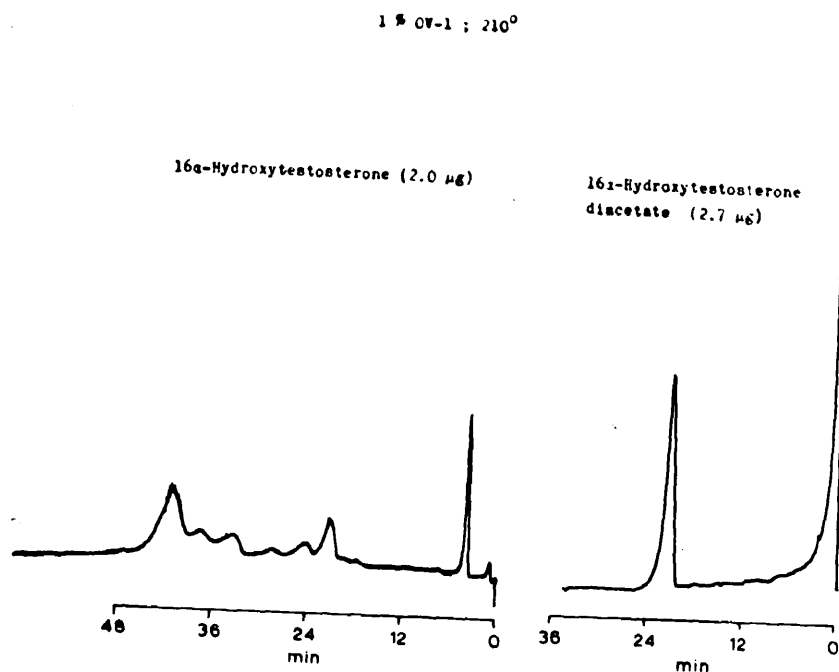


Fig. 41

3.4.2.1 Preparación de acetatos

Al esteroide seco se añaden: 0,05 ml de piridina y 0.05 ml de anhídrido acético.

Se deja así 10-12 h a temperatura ambiente. Después de este tiempo, reactivo y disolvente se evaporan con una corriente de nitrógeno, quedando así preparados para analizar en cromatógrafo gas-líquido.

3.4.2.2 Preparación de TMSi (trimetilsilileteres)

Al esteroide bien seco se le añaden: 0,1 ml de piridina, 0,02 ml de hexametildisilazano y 0,01 ml de trimetilclorosilano. Los reactivos se dejan durante una hora a temperatura ambiente y después de este tiempo se evaporan con una corriente de nitrógeno.

3.4.3 Técnica de inyección

En nuestro laboratorio hemos ensayado y utilizado con buenos resultados la inyección sólida, que consiste en aplicar las muestras sobre un pequeño rectángulo de red metálica -acero inoxidable- enrollado en espiral. Resulta una especie de cilindro de 2mm diámetro int. x 3 mm de altura. En la figura 42 puede verse un dispositivo especial -mo

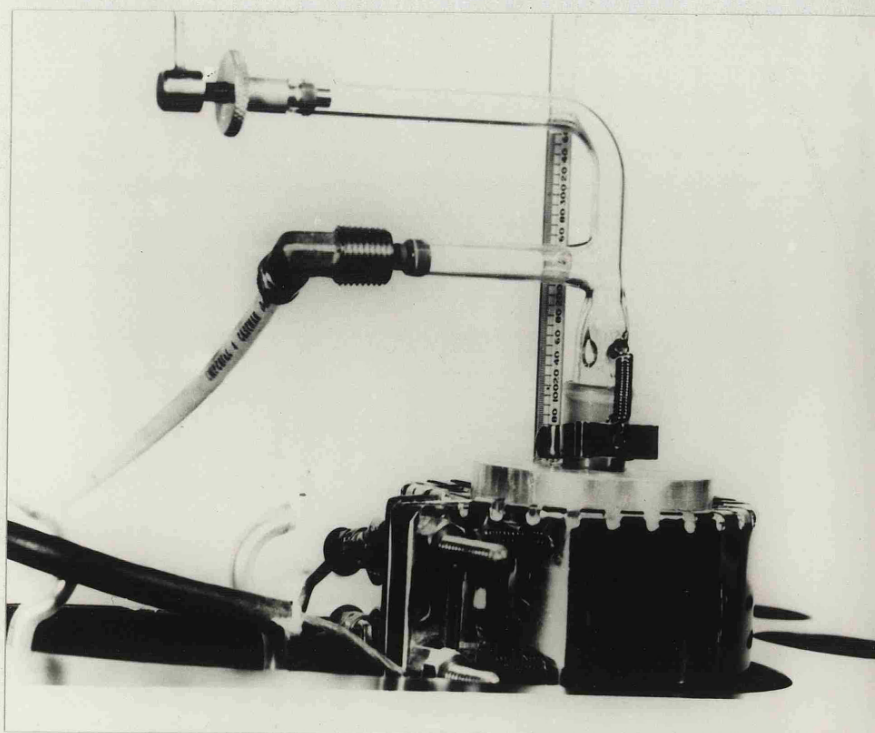


Fig. 42

dificación introducida en el gas-cromatógrafo Pye- que tiene la misión de recoger estas muestras y calentarlas a 250°C de modo que se evaporen los esteroides y hagan el recorrido por la columna como gases.

La figura 43 muestra esquemáticamente el lugar de colocación de las mallas.

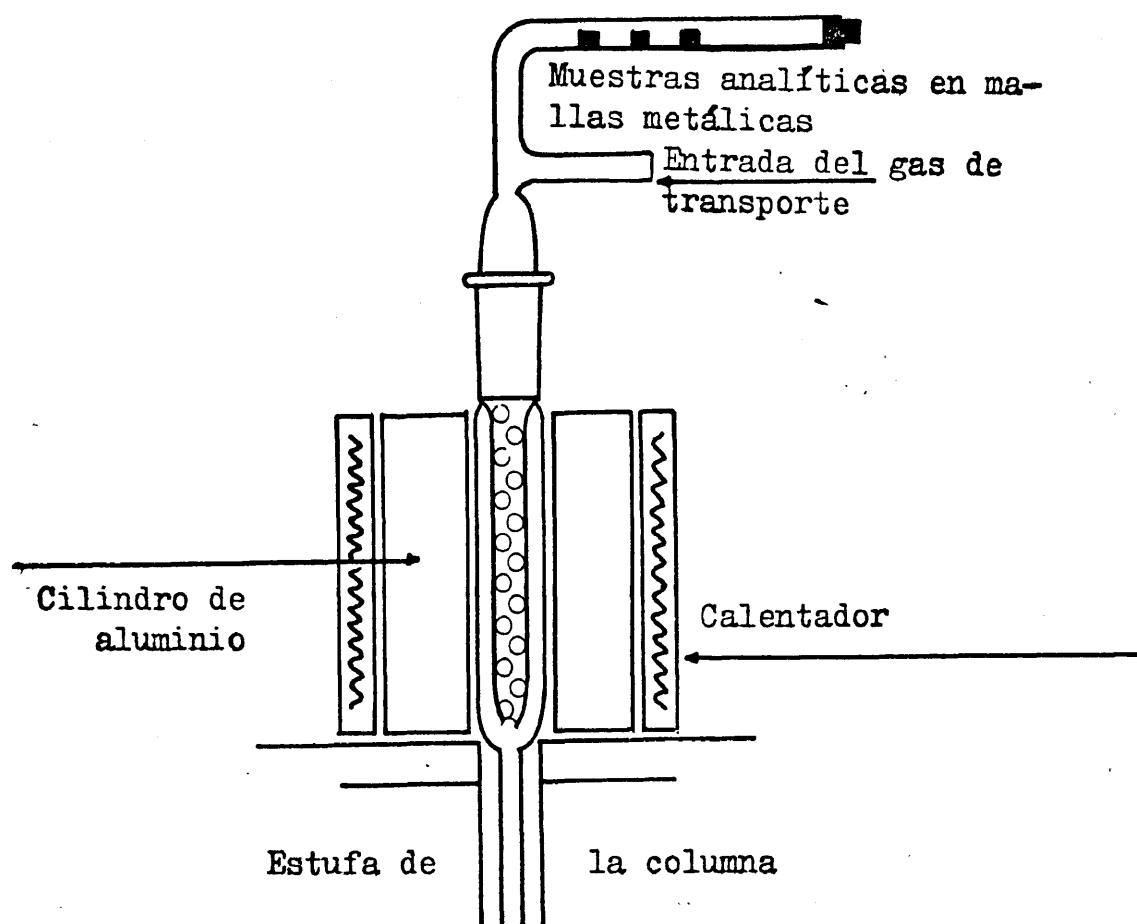


Fig. 43

Las mallas previamente confeccionadas, se colocan en las oquedades capsulares de una placa de "teflon" (poli-

tetrafluor-etileno). Es esencial que la superficie de estas oquedades esté perfectamente pulimentada para que el disolvente no moje la placa. Las mallas se dejan en estas oquedades sobre una gota de cloroformo.

Sobre la malla se coloca la muestra, recogida en un pequeño volumen de cloroformo o hexano (10-25 μ l), o también etanol (máx. 10 μ l). Se deja secar a temperatura ambiente.

La concentración del esteroide en el volumen de cloroformo, se va haciendo cada vez mayor. Cuando queda la última gota es absorbida ávidamente por la malla según el principio de capilaridad; en la malla tiene lugar la evaporación total del disolvente, y el esteroide queda allí retenido en su totalidad.

Cuando están bien secas se pueden colocar en el dispositivo del gas-cromatógrafo (fig. 43) anteriormente descrito. Para dejarlas caer en la columna nos servimos de un imán.

Se ha comprobado que la recuperación del material de estas placas es completa poniendo en la misma oquedad otra malla con cloroformo limpio y analizándola en cromatografía gas-líquido. Se ve que no sale ningún pico debido a la presencia de esteroides. (Fig. 44)

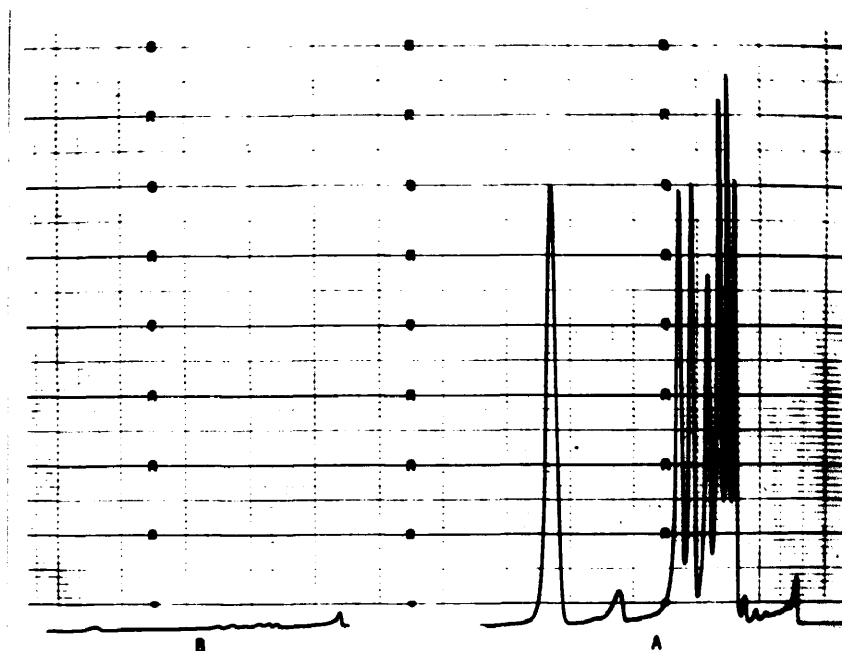


Fig. 44

3.4.4 Valoración de los resultados

En nuestro caso, que no se trataba de un estudio de rigor cuantitativo (el objetivo era la separación de los 16α -OH-esteroides), hemos preferido el método de utilización de una curva de proporcionalidad y medida de los picos por el sistema de las alturas.

El evitar el uso de un patrón interno nos ofrecía la ventaja de un notable ahorro de tiempo en el análisis de las muestras.

Igualmente simplifica mucho los cálculos, el uso del método de las alturas para la valoración de los picos, en lugar de la medida de las áreas, pues hemos comprobado,

que en picos de base muy reducida, como los que nosotros obtenemos, se puede utilizar sin peligro de errores significativos.

3.4.5 Análisis de esteroides patrón en distintos tipos de columna

La Tabla XVI muestra los tiempos de retención obtenidos en distintas columnas al analizar en cromatografía gas-líquido los esteroides trimetilsililéteres.

TABLA XVI

TMSi	OV-1 210°	OV-17 237°	QF-1 220°	XE-60 260°	OV-25 225°	OV-61 229°
E_3	20,8	15,6	6,1	10,8	10,8	12,0
16 α -OH-DHA	12,8	11,3	6,1	12,2	8,0	8,4
16 α -OH- E_1	-	-	-	-	14,6	-
16 α -OH-A	13,5	22,7	33,0	6,5	19,4	15,4
$\Delta^5 A_3$	18,7	9,7	4,0	6,7	6,0	7,6
16 α -OH-T	19,1	18,4	21,0	33,2	13,2	13,6
* colesterol	38,8	26,0	8,9	-	16,2	-
5 α colesterol	24,5	11,9	4,5	-	-	-
colestano	-	-	28,3	-	27,6	-

* compuesto patrón
Abreviaturas pág. XI

La figura 45 muestra un cromatograma que nos deja ver gráficamente la separación de estos compuestos trimetilsililéteres en la columna OV-25 (225°C).

En la Tabla XVII podemos ver los tiempos de retención obtenidos al analizar estos 16 α -OH-esteroides como compuestos acetilados.

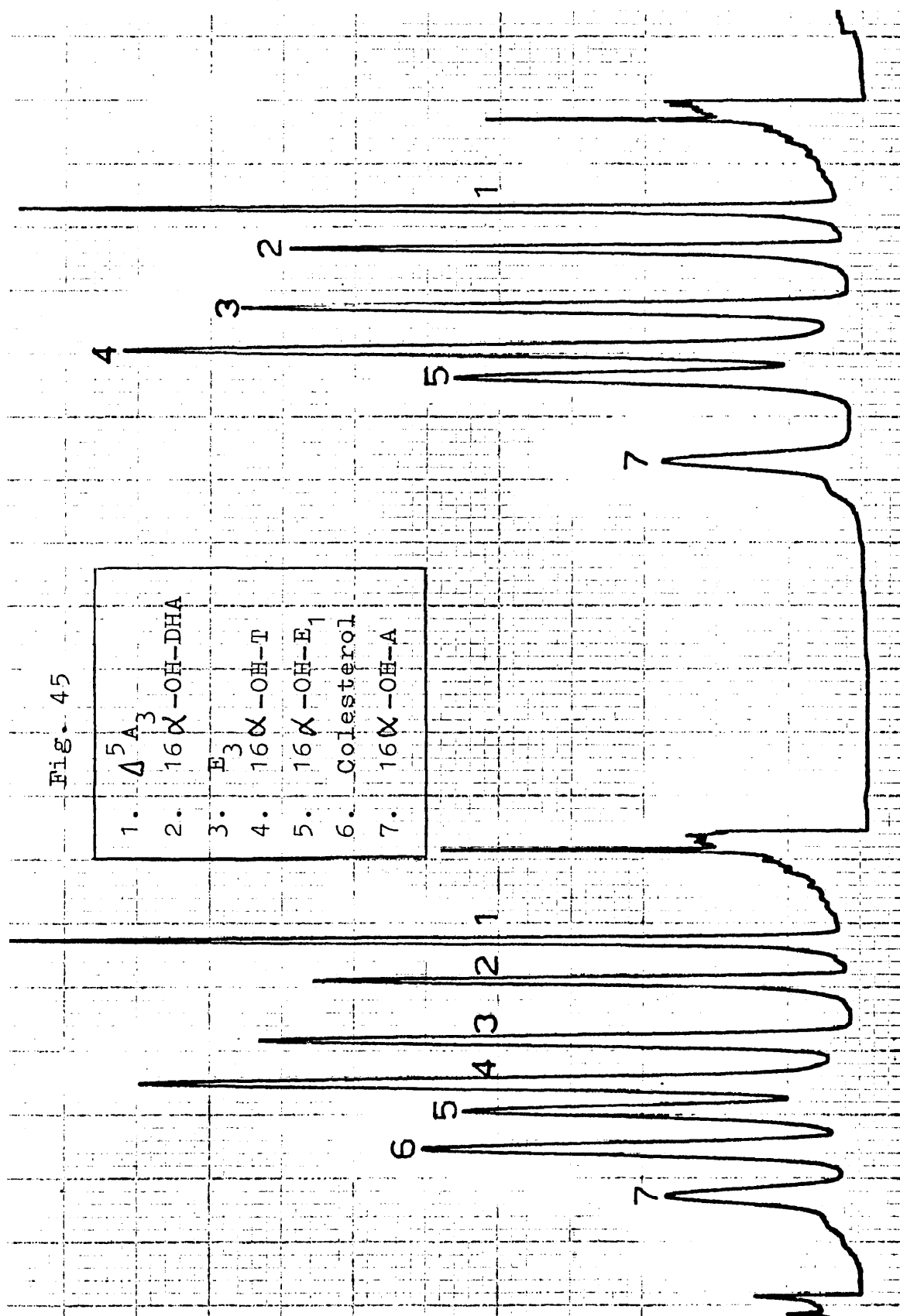
TABLA XVII

ACETATOS	OV-1 215°	QF-1 230°	OV-17 240°
E ₃	27,2	39,4	38,2
16 α -OH-DHA	18,7	29,8	22,6
16 α -OH-E ₁	21,8	-	32,4
16 α -OH-A	16,3	60,0	24,4
Δ^5 A ₃	24,1	28,2	25,2
16 α -OH-T	21,3	56,0	26,8
* colesterol	42,4	15,4	25,0
5 α -colesterol	14,4	3,3	6,8
colestano	-	19,4	-

* compuestos patrón
Abreviaturas pág. XI

Fig. 45

1.	$\Delta^5 A_3$
2.	$16\alpha\text{-OH-DHA}$
3.	E_3
4.	$16\alpha\text{-OH-T}$
5.	$16\alpha\text{-OH-E}_1$
6.	Cholesterol
7.	$16\alpha\text{-OH-A}$



Abreviaturas pág. XI

3.5 PREPARACION DEL TEJIDO PLACENTARIO

Las placentas utilizadas se recogieron e incubaron en su mayoría inmediatamente después del parto. Sólo en algunos casos el tejido placentario, debidamente preparado, se conservó por algún tiempo a -20°C antes de la incubación.

Para la preparación del tejido placentario se ha seguido fundamentalmente el procedimiento descrito por Ryan 1959, (82). Todas las operaciones requeridas por este proceso se han llevado a cabo a una temperatura comprendida entre 0°C - 4°C .

La placenta, libre de las membranas y cordón umbilical, se pasa varias veces por papel de filtro para dejarla lo más limpia posible de sangre. Una vez preparado así el material, se pesa.

La homogeneización se lleva a cabo triturándolo mecánicamente en un Waring Blandor refrigerado, durante 1-2 min, con un tampón -Tampón A, pH7- que contiene 0,25M sacarosa, 0,05M fosfato y 0,04M nicotinamida. La proporción óptima parece ser la de 3 gr de tejido/ml tampón.

Para favorecer la rotura de las células se van tomando pequeñas fracciones que previamente han sido bien

desmenuzadas en una máquina de las que se usan comunmente en cocina para triturar carne.

A continuación se procede a la separación de las distintas fracciones celulares, utilizando las técnicas de centrifugación diferencial de Schneider y Hogeboom, 1950, (105). (Esquema D).

La primera centrifugación se lleva a cabo en una centrífuga refrigerada M.S.E. Mistral 4L a 2.500 r.p.m. (1.020 x g) durante 20 min a 4°C.

El sobrenadante que contiene mitocondrias, microsomas y la fracción soluble de la célula, se centrifuga durante 30 min a 13.000 r.p.m. (10.000 x g) en una ultracentrífuga M.S.E. Super Sped 40. Aquí sedimentan las mitocondrias.

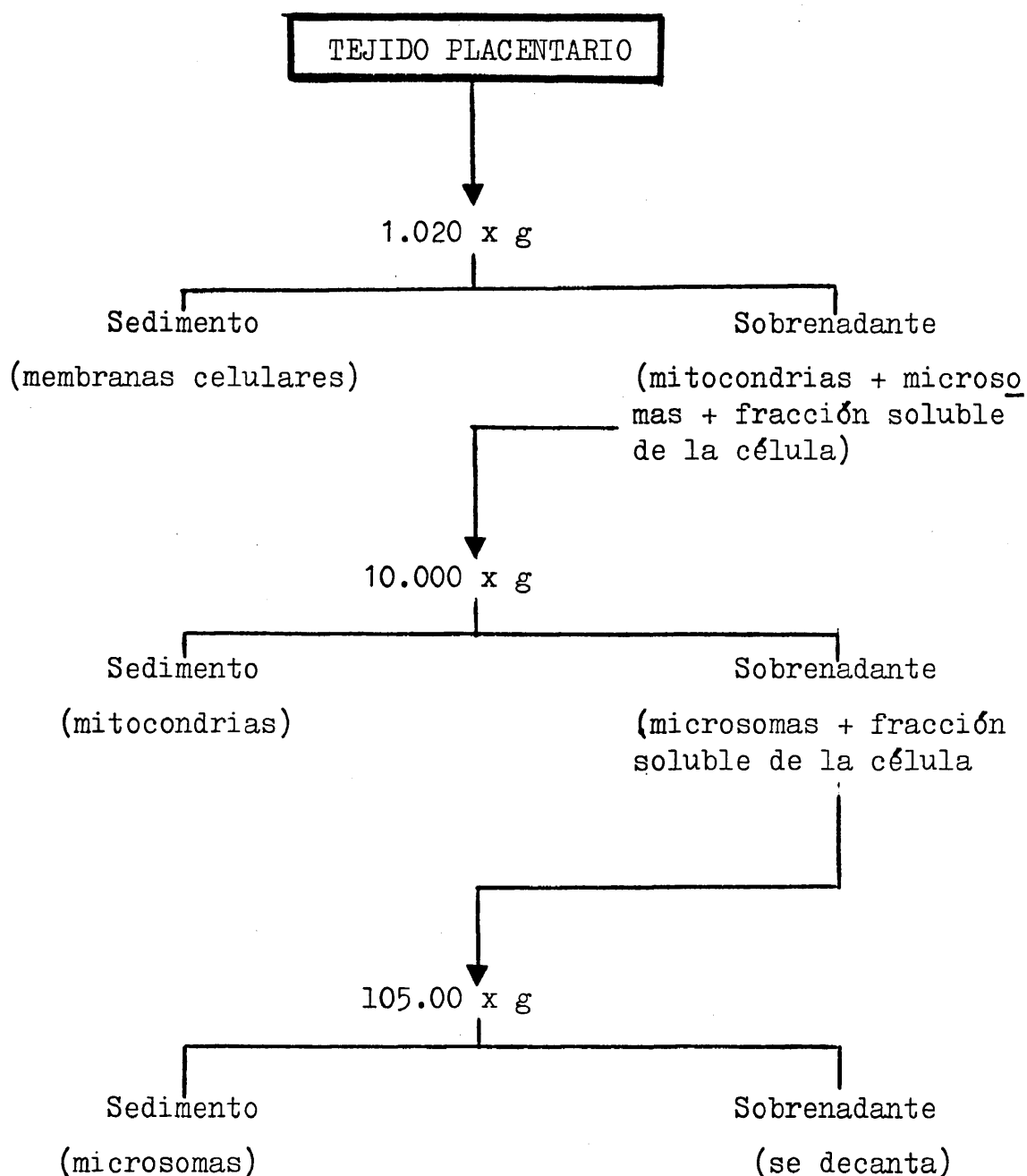
El sobrenadante, que contiene ahora los microsomas más la fracción soluble, se centrifuga durante una hora a 40.000 r.p.m. (105.000 x g) en la misma centrífuga.

Se decanta el sobrenadante y se traspasan los microsomas a un homogeneizador Potter Elveyen para lavarlos con un tampón -Tampón B, pH7- que contiene 0,05M fosfato.

Después de bien homogeneizado se centrifuga de nuevo durante una hora a 40.000 r.p.m. (105.000 x g). Se decanta el sobrenadante y se recogen los microsomas para redisuspenderlos en Tampón B en una proporción tal que queden a proximadamente 10 gr de tejido por ml.

Para este trabajo interesan fundamentalmente dos

ESQUEMA D. PREPARACION DEL TEJIDO PLACENTARIO



Centrifugación diferencial (2) aplicada a la preparación del tejido placentario

de las fracciones obtenidas: el sobrenadante de la centrifugación a 10.000 x g, que se designará a lo largo del trabajo con la siguiente expresión: F_{10.000 x g}, y el sedimento de la centrifugación a 105.000 x g, que se designará con la letra M (microsomas).

Estas preparaciones pueden conservarse a -20°C por dos o tres meses sin que pierdan su actividad.

3.6 INCUBACION DE SUSTRATOS ESTEROIDES CON TEJIDO PLACENTARIO

Los esteroides utilizados como sustratos de incu
bación para los distintos experimentos han sido los siguien
tes:

DHA	- dehidro-epiandrosterona
A	- androstendiona
T	- testosterona
$\Delta^5 A_2$	- androstendiol
19-OH-DHA	- 19-hidroxi-dehidroepiandrosterona
19-OH-A	- 19-hidroxi-androstendiona
19-OH-T	- 19-hidroxi-testosterona
DHA.S	- dehidro-epiandrosterona-sulfato
$\Delta^5 A_2.S$	- Δ^5 -androstendiol-sulfato
16 α -OH-DHA	- 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona
16 α -OH-A	- 16 α -hidroxi-androstendiona
16 α -OH-T	- 16 α -hidroxi-testosterona

Se ponen alrededor de 100 μ g de sustrato por ca-
da matraz de incubación, y se lleva a sequedad.

A continuación se añade un sistema generador de

NADPH (106) constituido por:

NADP	- 5 mg		0,2 ml Tampón B
G6P	- 10 mg		
G6PDH	- 2 U	→	0,1 ml Tampón B

y se tiene durante 20 minutos en incubadora Dubnoff a 37°C, disuelto en 0,7 ml de tampón B.

Una vez generado el NADPH, se ponen en cada matraz de incubación alrededor de 10 gr de tejido (fracción 10.000 x g o fracción de los microsomas, según los experimentos), y la cantidad de tampón B necesaria para llevar cada matraz de incubación a un volumen final de 6 ml. Se pone de nuevo en la incubadora Dubnoff a 37°C durante 45 minutos. La incubación tiene lugar en presencia de O₂ (aire). (Esquema E)

Para recuperar los productos formados en la incubación, se han utilizado dos procedimientos distintos, según los casos:

- 1) 3 extracciones con 10 ml de acetato de etilo
- 2) 3 extracciones con 10 ml de una mezcla de eter: clororoformo (3:1)

En este segundo caso se obtienen extractos más purificados. Por esto, se ha utilizado este procedimiento cuando había que trabajar posteriormente con cromatografía gas-líquido.

E S Q U E M A E

GENERACION DE NADPH → 20 minutos	
NADP - 5 mg G6P - 10 mg G6PDH - 2 U	0,7 ml Tampón B, pH 7
INCUBACION TEJIDO + SUSTRATO → 45 minutos	
M ♂ F 10.000 x g 100 µg esteroide	en Tampón B, pH 7 vol. final: 6ml

3.7 DETERMINACION DE LOS ESTEROIDES FORMADOS EN LA INCUBACION

A continuación describimos los métodos utilizados para la determinación de los estrógenos y de los 16 α -hidroxi-esteroides precursores.

3.7.1 Determinación de los estrógenos (Esquema F)

Se ha llevado a cabo según una adaptación del método de Brown para estrógenos en orina (107).

3.7.1.1 Separación fenólica

El extracto obtenido del medio de incubación que contiene los esteroides, se pasa a un matraz de fondo redondo para llevarlo a sequedad en un evaporador de vacío, rotavapor "R Büchi", Suiza.

Los esteroides se disuelven en 1 ml de etanol. Se añaden 25 ml de hexano y 25 ml de benceno y se pasa a los embudos separadores. En la mezcla hexano-benceno (1:1), se disuelven todos los residuos de la incubación. La fase orgánica se extrae con:

- 2 x 25 ml de agua para el caso de los extractos que

contienen estriol.

- 2 x 25 ml de hidróxido sódico 0,4 N para los que tienen estrona y estradiol.

A los extractos acuosos que contienen estriol, se les añade 1 ml NaOH 10 N. En uno y otro caso se recogen los esteroides en matraces que contienen de 0,7-0,9 gr de ácido bórico para formar un tampón de ácido bórico-borato, óptimo para la metilación de los estrógenos.

3.7.1.2 Metilación

Para la metilación se añade 1 ml de dimetil-sulfato $(CH_3)_2SO_4$. Se agita fuertemente y se lleva a baño-maría a 37°C durante 20 minutos. Para que se complete la metilación y, al mismo tiempo, para neutralizar el ácido sulfúrico formado en la primera fase de la reacción, se añade de nuevo 1 ml de NaOH 10 N y 1 ml de dimetil-sulfato. Se agita fuertemente y se lleva a baño-maría a 37°C durante otros 10 minutos.

Al producto metilado se añaden 5 ml de NaOH 10 N y 2,5 ml de H_2O_2 , y se pasa a embudos separadores para extraer la estrona y estradiol con 25 ml de hexano, y el estriol, con 25 ml de benceno. Se lava dos veces con 5 ml de agua.

3.7.1.3 Cromatografía de adsorción en columna de alúmina

Los esteroides metilados y recogidos en 25 ml de

hexano o benceno, según los casos, pasan a una columna de cromatografía para liberarse de las sustancias cromógenas que pueden más tarde interferir la reacción de Kober.

Se usan columnas de vidrio de 1 cm de diámetro y 8 cm de altura, con llave reguladora de la caída del líquido y embudo superior para recoger el eluyente.

Cerrada la llave, se ponen en la columna de 15-20 ml de hexano o benceno y, en este medio líquido que favorece la homogeneización del sistema, se prepara la columna.

Se pone primero un poco de algodón lavado en un Soxhlet, a continuación una capa muy fina de cuarzo granulado (aproximadamente 2-3 mm de espesor), y sobre ella se dejan caer 2 gr de alúmina previamente desactivada y estandarizada. Cuando ya ha descendido y se ha dispuesto uniformemente en el fondo de la columna se añade otro poco de cuarzo, que evita que la alúmina se remueva cuando se van vertiendo los distintos disolventes. Se abre la llave y se deja correr el hexano o el benceno que, mientras pasa, va lavando la columna.

A través de esta columna así preparada se deja pasar el extracto poco a poco (vel=20-30 gotas/min). Los estrógenos y los pigmentos quedan adsorbidos por la columna de alúmina. El hexano y benceno son eliminados.

Para recuperar y separar los estrógenos de las otras sustancias, se eluye la columna con los siguientes disolventes:

Para estrona y estradiol se han utilizado:

1. 8 ml 2,5% hexano/benceno
2. 17 ml 40% hexano/benceno
3. 8 ml 40% hexano/benceno
4. 15 ml benceno
5. 10 ml 1,4% etanol/benceno

Para el estriol:

6. 10 ml 1,4% etanol/benceno
7. 15 ml 4% etanol/benceno
8. 5 ml 5% etanol/benceno

En las fracciones 2,4 y 7 se recogen respectivamente estrona, estradiol y estriol metilados en 3.

3.7.1.4 Reacción de Kober (108)

Esta reacción se ha llevado a cabo según el procedimiento descrito por Brown, 1955 (109).

Los tubos que contienen las distintas fracciones de la elución de la columna, se llevan a sequedad en un baño de agua a temperatura de alrededor de 90°C.

Una vez bien secos se añade a cada tubo 3 ml del reactivo correspondiente:

Para estrona \rightarrow SO_4H_2 66% más 2% de hidroquinona

Para estradiol \rightarrow SO_4H_2 60% más 2% de hidroquinona

Para estriol \rightarrow SO_4H_2 76% más 2% de hidroquinona

El reactivo se pasa bien por las paredes del tubo y se lleva a baño hirviente durante 20 min. Conviene agitar los tubos durante los cinco primeros minutos de ebullición. Pasado este tiempo, se sacan y se dejan enfriar.

Pasamos así a la segunda parte de la reacción en la que se añade agua destilada en las siguientes proporciones:

0,5 ml para la estrona
0,2 ml para el estradiol
1,0 ml para el estriol

Se agita y se lleva otra vez a baño de agua hirviente durante 10 min más para total desarrollo del color, que vira en esta segunda parte de la reacción.

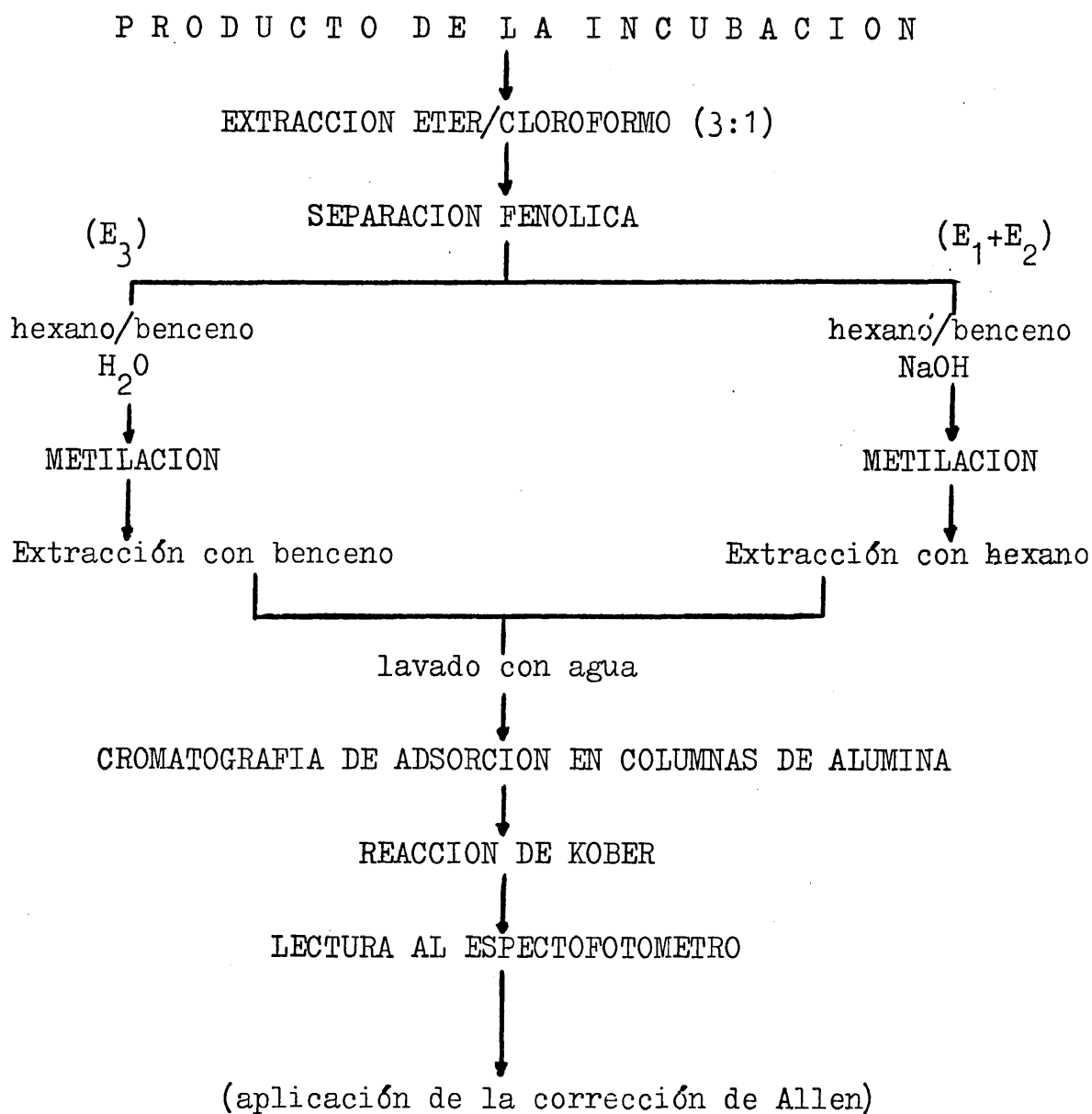
La reacción de Kober se lleva a cabo al mismo tiempo con cantidades conocidas de patrones metilados, y con un blanco.

La valoración cuantitativa se hace leyendo los patrones y las muestras con un espectrofotómetro UNICAM SP 600, a tres longitudes de onda diversas, aplicando la corrección de Allen, 1950, (110). Aplicando esta fórmula se elimina la coloración debida a ciertas sustancias promógenas que todavía no han sido eliminadas.

Estrona y estriol	480 nm, 516 nm , 552 nm
Estradiol	480 nm, 518 nm , 556 nm

Los resultados se expresan en nano-moles de estrógeno formado/ por gr de tejido incubado, en 45 minutos.

ESQUEMA F DETERMINACION DE LOS ESTROGENOS FORMADOS
EN LA INCUBACION



3.7.2 Determinación de los 16 α -OH-esteroides formados en la incubación

La determinación de estos compuestos se hace mediante cromatografía gas-líquido de los trimetilsililéteres derivados después de la purificación del extracto obtenido en la incubación, mediante cromatografía en capa fina, como se ha descrito ampliamente en 3.3.1

En los casos en que se requiere una valoración cualitativa posterior, es necesaria la recuperación de los compuestos que interesan, mediante su elución en la placa. En este caso, se detectan los compuestos visibles a la luz ultravioleta, y se revela con dicromato potásico en ácido sulfúrico, solamente una de las bandas que contiene los esteroides-patrón.

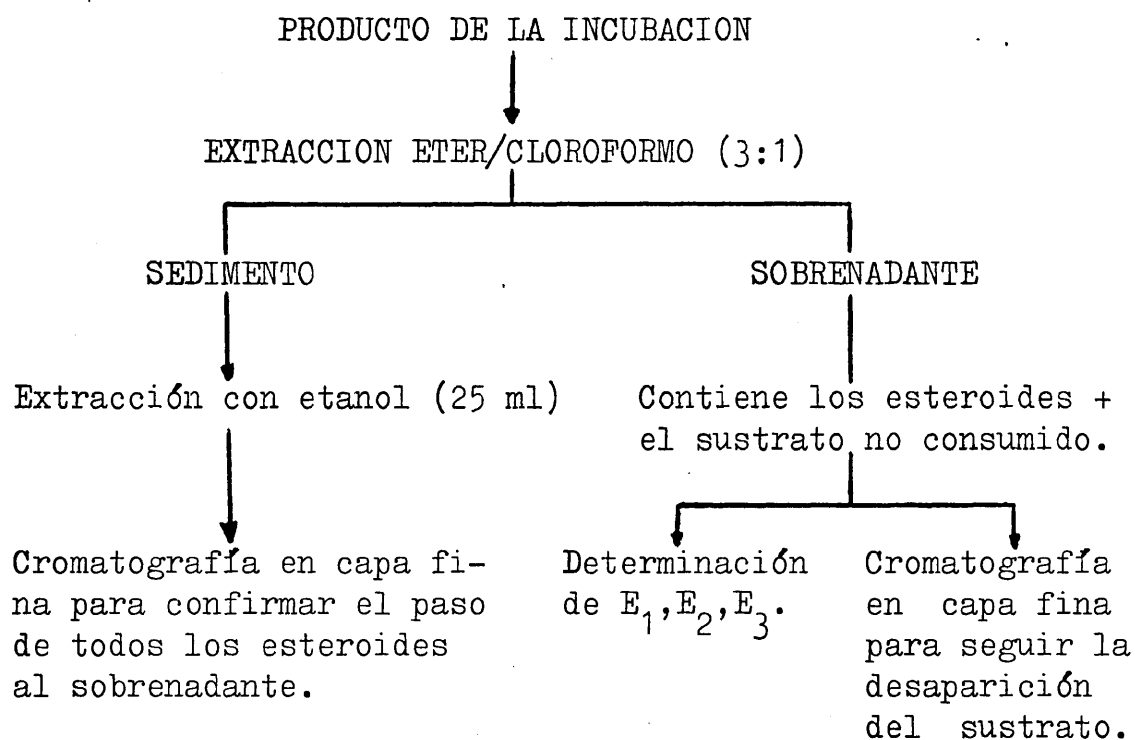
Las zonas en las que se han detectado compuestos visibles a la luz ultravioleta, y aquellas que se encuentran a la misma altura que las manchas coloreadas en las bandas correspondientes a los esteroides-patrón, se recogen raspándolas con una espátula y dejándolas caer sobre un tubo de centrifuga, donde se tritura el polvo con una varilla de vidrio. De aquí se eluye por tres veces con 5 ml de acetato de etilo saturado con agua.

Cada una de las veces que se centrifuga y se recoge el sobrenadante. El total de las tres recogidas se lleva a sequedad, quedando así preparado para su reconocimiento en cromatografía gas-líquido como se describe en 3.4 .

3.7.3 Otros estudios cualitativos

En algunos casos, además de la determinación de los estrógenos formados en la incubación, se hicieron dos estudios de tipo cualitativo: uno para ver la desaparición del sustrato incubado, en relación con los nuevos compuestos que van apareciendo, y otro, para comprobar que todos los esteroides formados en la incubación pasan al sobrenadante en la extracción con éter:cloroformo (3:1). Esquema G

ESQUEMA G



3.7.3.1 Desaparición del sustrato

El estudio cualitativo de este proceso se hizo mediante cromatografía en capa fina (ver 3.3.1).

Se tomó $1/5$ del volumen total del sobrenadante de la extracción con éter/cloroformo (3:1) y se llevó a sequedad. El extracto seco se recogió con $100\ \mu\text{l}$ de etanol, y se puso sobre una placa cromatográfica que se desarrolló en sistema éter/benceno (1:1) para los extractos provenientes de la incubación de DHA y en sistema benceno/acetato de etilo (1:3) (dos veces) para los provenientes de la incubación con 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona.

3.7.3.2 Examen del residuo de la extracción con éter:cloroformo (3:1)

Al residuo de la extracción se le añaden 25 ml de etanol, se agitan con una varilla de vidrio y se dejan a -25°C durante 24 horas, obteniendo así una precipitación de los lípidos.

Después de este tiempo se centrifuga a 2.500 r.p.m. durante 30 minutos y se deja otras 24-48 horas a -20°C .

Se hace una segunda centrifugación, también a 2.500 r.p.m., y se deja de nuevo a -20°C . El sobrenadante de esta segunda centrifugación se recoge y se lleva a sequedad.

$1/4$ del extracto disuelto en etanol se coloca so

bre la placa para realizar una cromatografía sobre capa fina.

Las placas que contenían el residuo de la incubación con dehidro-epiandrosterona se desarrollaron en sistema éter/benceno (1:1). Las que contenían el residuo de la incubación con 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona, con benceno: acetato de etilo (1:3) (2 desarrollos). La verificación de las placas en uno y otro caso se realizó como se expone en 3.3.1 .

3.8 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD SULFATASICA EN LA PLACENTA

Se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Warren y French, 1965 (111).

Se usaron como sustratos para la incubación:

- a. Dehidro-epiandrosterona-sulfato $4C^{14}$ (0,3 mol; 20.000 d.p.m.)
- b. Pregnenolona-sulfato $7\alpha H^3$ (0,3 mol; 35.000 d.p.m.)

El tejido placentario se preparó como se indica en el Esquema D. La homogeneización se hizo en un tampón tris (Tampón C, pH, 7,4) que contiene 0,007 M $Mg Cl_2$.

Del homogeneizado se tomaron cinco ml equivalentes a 0,05 gr de tejido placentario y se incubaron con los sustratos anteriormente citados (a,b) en una Dubnoff metabólica a 37°C durante 20 minutos.

Al terminar el tiempo de la incubación se terminó la reacción agitando la mezcla dos veces con 10 ml de éter etílico frío.

El extracto etéreo, que contiene los esteroides libres, fue llevado a sequedad en un baño-maria a una tempe

ratura en torno a los 40°C.

Al extracto seco se le añadieron 15 ml de perfluor. La radioactividad asociada a los esteroides libres contenidos en la fase etérea se midió con un contador de radio actividad de centelleo líquido, modelo Mark II, de la Casa Nuclear Chicago.

La actividad sulfatásica se expresa en nano-moles de esteroides sulfatos hidrolizados por gramo de tejido en 20 minutos.

3.9 DETERMINACION DE ESTEROIDES URINARIOS Y PLASMATICOS DURANTE EL EMBARAZO

3.9.1 Determinación de estriol urinario

Se ha llevado a cabo según el método de Brown, 1968 (107), modificado por Menini y Bompiani, 1969 (112).

Se siguieron los pasos indicados en el Esquema H, que se muestra a continuación:

ESQUEMA H

1. Hidrolisis de la orina con $\text{ClH} + \text{ClNa}$
2. Extracción con éter etílico
3. Lavado con una solución Tampón D pH 10,5
4. Separación fenólica: éter:hexano/ NaOH 1 N
5. Se añade CO_3HNa (pH 10,3)
6. Extracción con éter
7. Evaporación del éter
8. Residuo preparado para la reacción de Kober
(Auto Analyzer)

Las operaciones 2, 3, 4 y 5 del método se efectúan en un aparato extractor semiautomático ideado por Brown, 1968 (111), (Fig. 46)

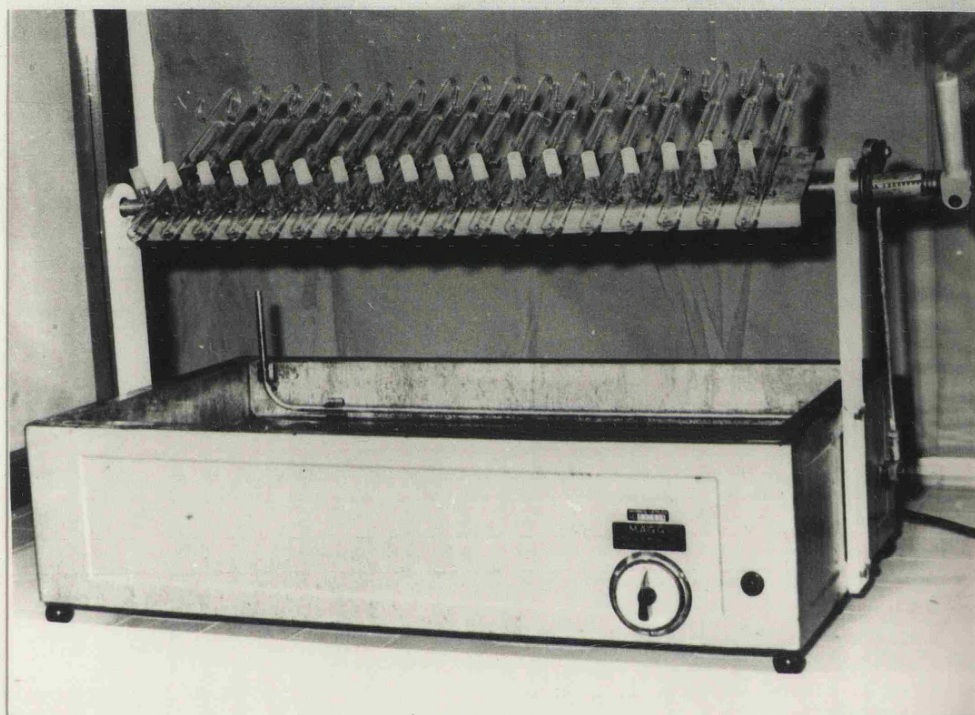


Fig. 46

En el método de Brown la reacción colorimétrica para poner en evidencia los estrógenos, Kober, 1931 (108), se efectúa manualmente, Brown, 1955 (109), y la densidad óptica de las muestras se mide a tres longitudes de onda distintas, en un espectrofotómetro UNICAM SP 600 y aplicando la corrección de Allen.

Recientemente E. Menini y A. Bompiani han puesto a punto en nuestro laboratorio, un sistema para realizar automáticamente la reacción de Kober para los estrógenos y la lectura colorimétrica de las muestras. (Fig. 47a y 47b).

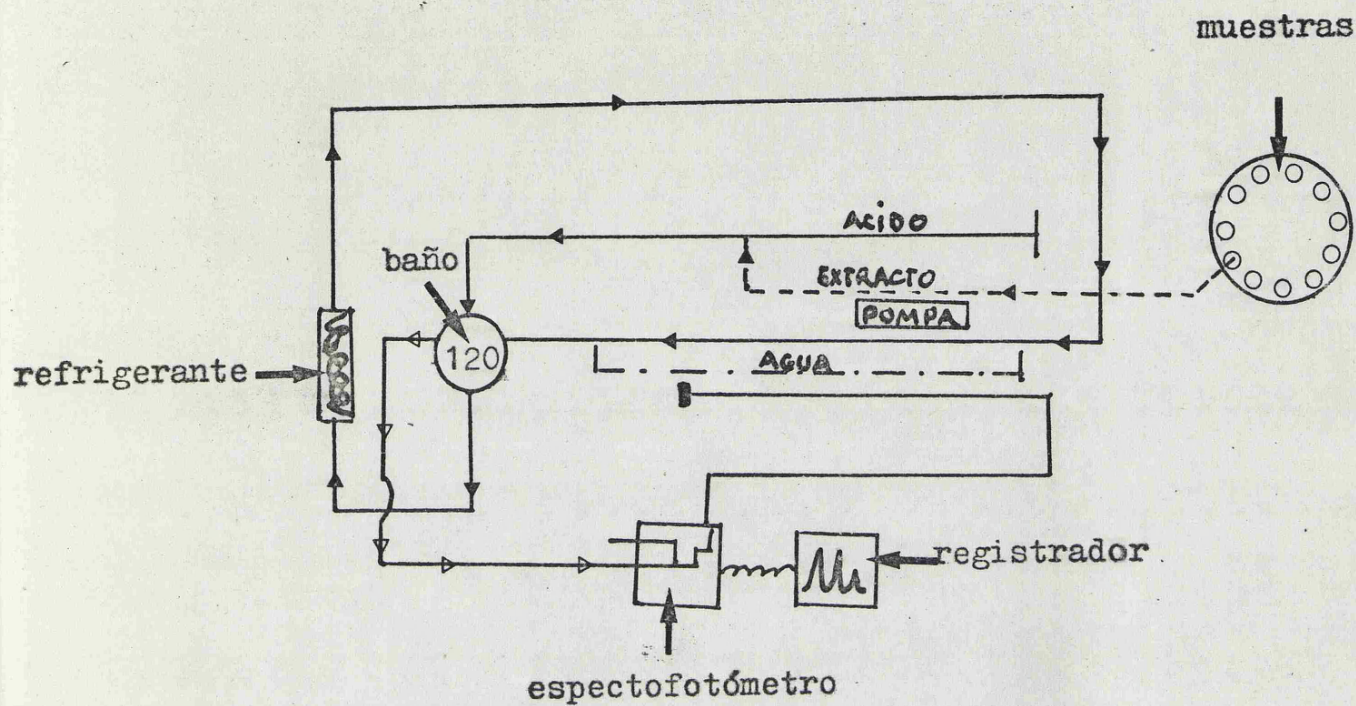


Fig. 47a AutoAnalyzer para determinación de estrógenos durante el embarazo

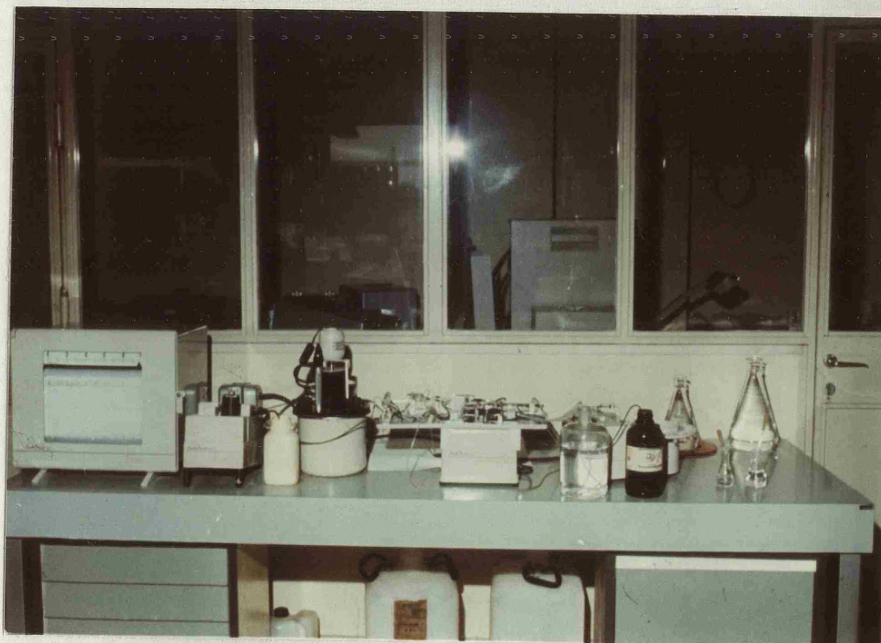


Fig. 47b

El extracto seco que se obtiene después de la evaporación del extracto etéreo, purificado en el aparato de Brown, y que contiene los estrógenos urinarios, se recoge con NaOH 0,1 N y se mezcla con un reactivo de Kober modificado (2% de hidroquinona en ácido sulfúrico al 90%) de modo que se obtiene un ácido sulfúrico 77%. Esta solución pasa primero a través de una serpentina para mezclas, y en un segundo momento, a través de un baño de aceite termoregulado a la temperatura de 120°C.

A la salida del baño (donde ha tenido lugar la primera parte de la reacción de Kober), la solución se enfría y se diluye con la cantidad de agua necesaria para el desarrollo de la segunda parte de la reacción. Esta tiene lugar, siempre a 120°C, en el mismo baño que se ha utilizado para la primera parte de la reacción.

Cuando la reacción se ha terminado (máximo desarrollo del color), la solución pasa a través de un colorímetro que contiene una célula a flujo continuo, donde queda registrada la densidad óptica de las muestras a 520 m μ en forma de picos, la altura de los cuales es proporcional a la cantidad de estriol presente en las muestras urinarias.

La correlación de los resultados obtenidos con el método original de Brown, 1968, (111) puede verse en la Fig. 48.

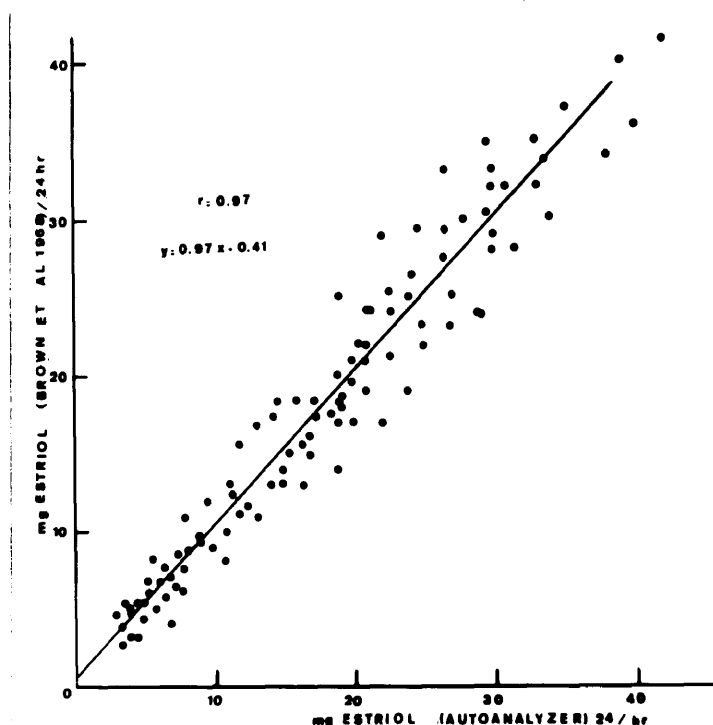


Fig. 48 Resultados obtenidos con el método original de Brown.

3.9.2 Determinación del pregnandiol urinario (Esquema J)

Se ha llevado a cabo siguiendo un método desarrollado en nuestro laboratorio.

3.9.2.1 Hidrólisis de la orina

1 ml de orina de mujer embarazada se diluye hasta un volumen de 30 ml. La orina diluida se pasa a un matraz de fondo redondo -de 100 ml de capacidad- que contiene 10 ml de tolueno y 1 ó 2 cristales de cuarzo. Se pone en un baño de arena caliente y se conecta con un refrigerante a

reflujo.

Cuando comienza la ebullición se añaden, a través del refrigerante, 3 ml de ácido ClH concentrado.

La hidrólisis de la orina se realiza en un periodo de 10 minutos.

3.9.2.2 Separación fenólica

Terminada la hidrólisis los matraces se dejan en friar. En su contenido, se disuelven alrededor de 5 gr de ClNa. El conjunto pasa a embudos separadores (de 150 ml de capacidad) y después de añadir 20 ml más de tolueno se agita lentamente alrededor de tres minutos.

La fase acuosa se decanta y el tolueno se lava, primero con 10 ml de ClNa al 25% en NaOH 1 N y después, dos veces más, con 10 ml de agua.

El tolueno se recoge y pasa a matraces de fondo redondo (100 ml de capacidad) teniendo cuidado de que no pase ninguna gota de la fase acuosa de las adheridas a las paredes del embudo separador. El extracto se lleva a sequedad en un evaporador Rotavapor "R" Büchi, Suiza.

3.9.2.3 Acetilación y purificación

Al residuo seco se añaden 0,1 ml de piridina y 0,1 ml de anhídrido acético, y se deja acetilar durante sesenta minutos a 50°C.

La mezcla se diluye con 5 ml de benceno y se hace pasar por una columna de vidrio que contiene 1 gr de alúmina. Se recoge el producto de la elución. Por la columna se pasan 2 ml más de benceno que se recogen también en el mismo tubo. El extracto bencénico se lleva a sequedad a baño-maría.

El residuo se recoge a 50 μ l de etanol y se pone sobre capa fina de gel de sílice.

Al mismo tiempo, sobre la misma placa, se ponen lateralmente alrededor de 10 μ g de pregnandiol di-acetato-patrón. La placa se desarrolla en un sistema ciclohexano:acetato de etilo (8:2).

Las zonas laterales, donde se han desarrollado las muestras, se colorean con una solución de dicromato potásico en ácido sulfúrico concentrado. El gel de sílice de las zonas que contienen el pregnandiol di-acetato urinario (altura correspondiente a las de las manchas evidenciadas), se recoge y se pasa a una columna de vidrio que contiene un poco de algodón hidrófilo y un estrato de arena marina, previamente lavada con 5 ml de acetona. El gel de sílice se eluye con acetona.

El eluido se recoge en un tubo y se lleva a sequedad.

El residuo se recoge con 100 μ l de etanol destilado. Una fracción de este extracto (1/25; 1/50; 1/100, según la concentración del pregnandiol di-acetato) se analiza mediante cromatografía gas-líquido.

3.9.2.4 Cromatografía gas-líquido

Aparato usado: Carlo Erba Mod. G.I

Columna: Vidrio
150 cm de largo

Fase estacionaria: OV-1 (1%)

Soporte inerte: gas Chrom. Q(100-120 mesh)

Temperatura de la columna: 230°-240°C

Flujo del gas de transporte: 40-45 ml/min

Cada día se prepara una curva patrón con las siguientes cantidades de pregnandiol di-acetato: 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 µg.

Los valores del pregnandiol di-acetato calculados en base a esta curva, se deben multiplicar por 0,8, que es la relación entre el peso molecular del pregnandiol y el del pregnandiol di-acetato.

ESQUEMA J DETERMINACION DEL PREGNANDIOLURINARIO DURANTE EL EMBARAZO

1. Hidrólisis de la orina
2. Separación fenólica
3. Acetilación y purificación en cromatografía sobre capa fina
4. Determinación en cromatografía gas-líquido

3.9.3 Determinación de los 17-ceto-esteroides urinarios (Esquema K)

Se hizo siguiendo el método descrito, que consiste en hidrólisis ácida de la orina, extracción con dicloroetano y lavado del extracto con NaOH 2 N y H₂O.

Cinco ml de orina se hidrolizan con 0,5 ml de ácido clorhídrico al 37% y se llevan a baño-maría a 100°C durante 20 minutos.

Se añaden 10 ml de 1-2 dicloroetano. Después se agita, centrifugando previamente en el caso de que se forme emulsión.

Se lava dos veces con 3 ml de NaOH 2 N, y otras dos veces con 3 ml de agua destilada, decantando siempre la parte superior y centrifugando previamente cuando se forme emulsión.

El extracto orgánico se lleva a sequedad y los ceto-esteroides urinarios se determinan cuantitativamente utilizando la reacción colorimétrica de Zimmerman.

Al extracto seco se le añaden 0,1 ml de meta-dinitrobenceno en alcohol absoluto al 0,5% y 0,05 ml de hidróxido de bencil-trimetil amonio al 40% en agua. Se deja a 4°C durante una noche o a 25°C durante dos horas en oscuridad.

Después se añaden 3 ml de etanol absoluto y se

lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 460-520-580 nm y en un tiempo máximo de 20 minutos para que no decaiga la coloración i violeta típica que se forma en la reacción.

Paralelamente al extracto seco se preparan dos muestras patrón con 10 μ g de dehidro-epiandrosterona y un blanco -sólo con los reactivos- con los que se lleva igualmente adelante la reacción.

ESQUEMA K DETERMINACION DE LOS 17-CETO-ESTEROIDES URINARIOS

1. Hidrólisis de la orina con HCl
 2. Extracción con 1,2-dicloroetano
 3. Lavado

2 veces con NaOH 2N

2 veces con H₂O destilada
 4. Reacción de Zimmermann

3.9.4 Determinación del dehidro-epiandrosterona.sulfato y 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona.sulfato en orina y plasma (Esquema N)

Se toman 20 ml de orina ó 5 ml de plasma diluidos en 5 ml de agua.

Se agitan dos veces sucesivas con 20 ml de éter

etílico para extraer y separar los esteroides libres. La fase orgánica que contiene estos esteroides se decanta.

Los esteroides-sulfato presentes en la fase acusa se hidrolizan usando el método de Burnstein y Libermann, 1958 (113).

A la fase acuosa se le añade ClNa hasta hacerla 20% (P/V) y se le añade SO_4H_2 para obtener un $\text{pH} = 1$. Los esteroides-sulfatos se extraen de esta solución acuosa con un volumen de acetato de etilo. Este extracto se deja 14-16 h a 37°C en baño-maría. El acetato de etilo que contiene los esteroides libres se lava con una solución acuosa de bicarbonato sódico al 5%. El extracto se lleva a sequedad. Se recoge con benceno y se pasa por una columna de alúmina desactivada, como se describe en 3.3.2.1 .

La dehidro-epiandrosterona y 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona se eluyen de la columna con una mezcla de 2,5% de etanol en benceno.

El eluido se lleva a sequedad y se purifica mediante cromatografía sobre capa fina, y la placa cromatográfica se desarrolla con un sistema ciclohexano/acetato de etilo (1:1), La zona correspondiente a la dehidro-epiandrosterona ($R_F=0,50$) y al 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona ($R_F=0,30$) se eluyen pasando tres veces 5 ml de acetato de etilo saturado con agua:

Los extractos evaporados y bien secos se dejan en un desecador de vacío durante dos horas. A partir de este extracto seco se preparan los trimetil sililéteres deri-

vados según el método descrito en 3.4.1.2 . Se toma una parte y se lleva a cromatografía gas-líquido:

Columna: Vidrio

150 cm de largo

Fase estacionaria: OV-210 (1,5%)

Soporte inerte: gas-Chrom. Q (100-120 mesh)

Temperatura de la columna: 193°C

Flujo del gas de transporte: 50 ml/min

Los tiempos de retención obtenidos en el cromatograma fueron: para la dehidro-epiandrosterona trimetilsililéteres, 12,2 minutos; para la 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona-trimetilsililéter, 13,8 minutos. La recuperación de la dehidro-epiandrosterona-sulfato y del 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona-sulfato en este método ha resultado ser de 78% y 72% respectivamente.

ESQUEMA N DETERMINACION DE DHA.S Y 16 α -OH-DHA EN ORINA Y PLASMA

1. Extracción con éter etílico:
-eliminación de los esteroides libres-
2. Solvolisis de los esteroides-sulfato
--(según Burnstein y Libermann)
3. Cromatografía en columna de alúmina
4. Purificación en cromatografía sobre capa fina
5. Preparación de trimetilsililéteres
6. Determinación cuantitativa en cromatografía gas-líquido

RESULTADOS

4.1 CONDICIONES OPTIMAS PARA LA REACCION DE AROMATIZACION

Las condiciones para esta serie de experimentos, se fijaron en base a las establecidas por Ryan, 1959 (82) al estudiar detalladamente "in vitro" los factores que intervienen en la aromatización de los esteroides en la placenta.

En el trabajo anteriormente mencionado pueden verse las curvas obtenidas para la conversión de Δ^4 -androst-4-en-3,17-diona en estrona en función de la cantidad de sustrato incubado y del tiempo de incubación. Para el primer experimento Ryan utilizó la fracción correspondiente a los microsomas; para el segundo la $F_{10.000 \times g}$.

En nuestro caso se repite esta experiencia pero con dos sustratos distintos: dehidro-epiandrosterona y 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona, y se hace en ambos casos con la $F_{10.000 \times g}$.

4.1.1 Estudio de la reacción de aromatización en función de la cantidad de sustrato incubado

Para llevar a cabo este estudio se hicieron incubaciones de tejido placentario con dehidro-epiandrosterona y 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona poniendo en cada matraz distintas cantidades de sustrato. (Tabla XVIII)

TABLA XVIII

1. sin sustrato	8. sin sustrato
2. con 20 μg de DHA	9. con 20 μg de 16α -OH-DHA
3. con 50 μg de DHA	10. con 50 μg de 16α -OH-DHA
4. con 100 μg de DHA	11. con 100 μg de 16α -OH-DHA
5. con 200 μg de DHA	12. con 200 μg de 16α -OH-DHA
6. con 400 μg de DHA	13. con 400 μg de 16α -OH-DHA
7. con 600 μg de DHA	14. con 600 μg de 16α -OH-DHA

4.1.1.1 Material utilizado

La placenta para estos experimentos provenía de una mujer que había tenido una gestación y un parto totalmente normales. La placenta, desde el punto de vista macroscópico, era también normal.

La preparación de la $F_{10.000 \times g}$ y la incubación se hicieron inmediatamente después del parto. Todos los procesos requeridos se llevaron a cabo a una temperatura comprendida entre los 0°C y los 4°C , y según los métodos ya descritos. (Esquema D, pág. 112; E, pág. 116).



La placenta, libre de membranas, cordón umbilical y sangre, preparada para la trituración, pesaba 300 gr. El volumen del sobrenadante obtenido en la centrifugación a $10.000 \times g$ era de 140 ml.

Por lo tanto se obtuvo un homogeneizado que contenía la cantidad de enzimas correspondientes a 2,14 gr de tejido/1 ml de $F_{10.000 \times g}$.

4.1.1.2 Incubación con dehidro-epiandrosterona y 16α -OH-dehidroepiandrosterona

Se dispusieron 14 matraces de incubación de 25 ml con distintas cantidades de dehidro-epiandrosterona y 16α -OH-dehidroepiandrosterona, como se indica en la Tabla XVIII.

El sustrato se llevó a sequedad con una corriente de N_2 . Después se puso en cada matraz el sistema productor de NADPH:

G6P - 10 mg		en 0,2 ml de Tampón B
NADP - 5 mg		
G6PDH - 2 U		en 0,1 ml de Tampón B

A todos los matraces se añadió, además, 0,7 ml de Tampón B. La producción de NADPH tuvo lugar a 37°C durante 30 minutos. A continuación se pusieron 4,7 ml de $F_{10.000} \times g$ equivalentes a 10 gr de tejido placentario, llegando a un volumen final de 6 ml .

Los productos formados en la incubación se recuperaron mediante tres extracciones sucesivas con 10 ml de éter/cloroformo (3:1). El extracto líquido, que contenía todos los esteroides, se llevó a sequedad.

En este caso, además de la determinación de los estrógenos, se hicieron cromatografías sobre capa fina para ver la desaparición del sustrato en relación con los nuevos compuestos formados en la incubación, y para comprobar que todos los esteroides formados en la incubación pasaban al sobrenadante en la extracción éter/cloroformo (3:1) (Esquema F, pág 122).

4.1.1.3 Desaparición del dehidro-epiandrosterona y 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona

La figura 49 muestra el aspecto de la placa cromatográfica en la que se estudió el proceso de la desaparición de la dehidro-epiandrosterona.

La Tabla XIX muestra los R_F correspondientes.

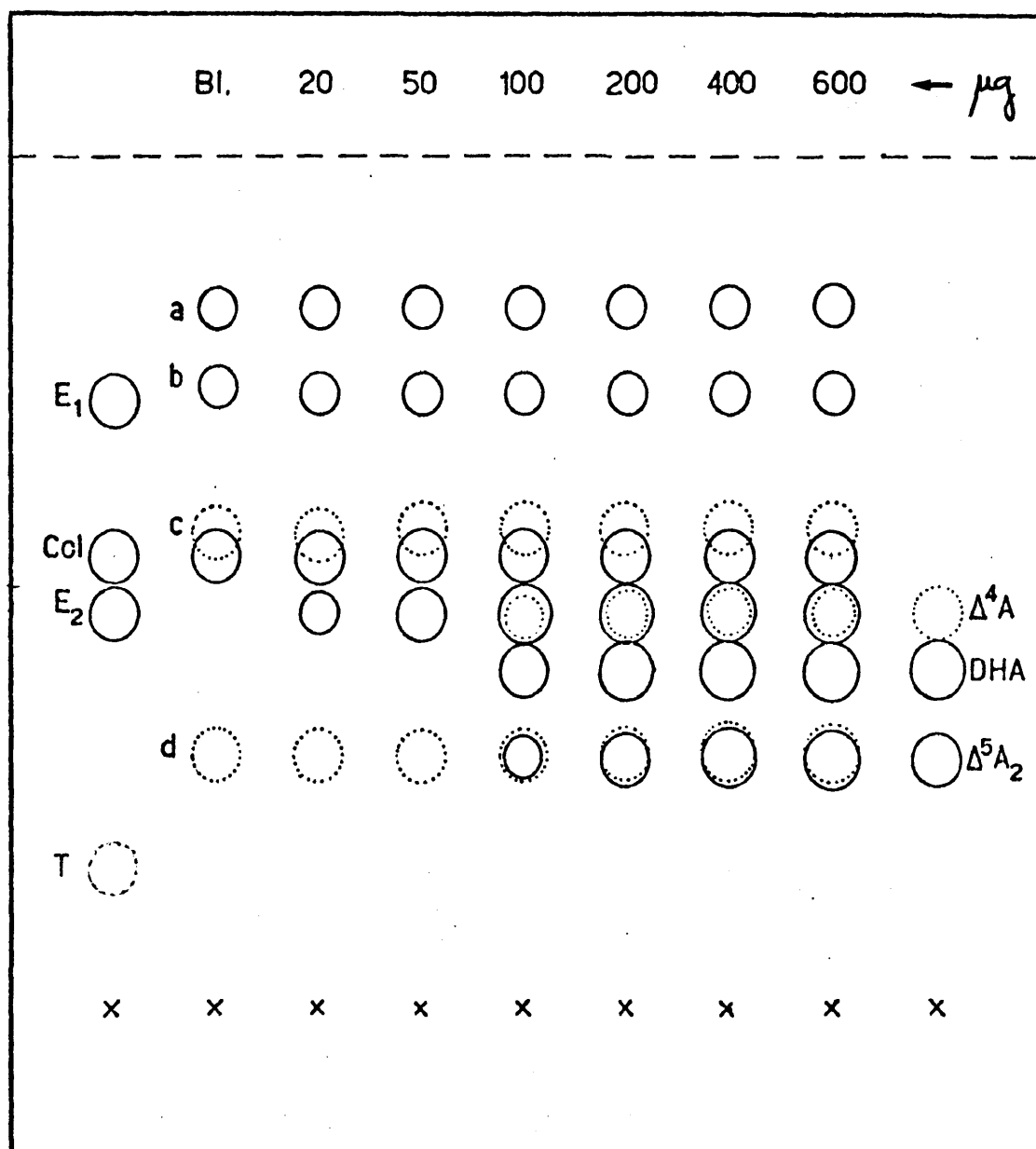


Fig. 49 Incubación de tejido placentario con DHA

a, b, c, d \rightarrow No interesan a nuestro estudio

Col \rightarrow colesterol

E₁ \rightarrow estrona

E₂ \rightarrow estradiol

$\Delta^4\text{A}$ \rightarrow androstendiona

DHA \rightarrow dehidro-

epiandrosterona

$\Delta^5\text{A}_2$ \rightarrow androstendiol

T \rightarrow testosterona

TABLA XIX

Compuestos	R _F
a	0,82
b	0,73
E ₁	0,72
c	0,56
Col.	0,53
E ₂	0,47
A	0,47
DHA	0,40
d	0,30
⁵ A ₂	0,29
T	0,17

TABLA XX

Compuestos	R _F
Col.	0,85
16 D	0,67
16 A	0,66
e	0,58
E ₃	0,32
f	0,30
⁵ A ₃	0,24
16 T	0,19
g	0,07

La figura 50 muestra el aspecto de la placa cromatográfica en la que se estudió el proceso de desaparición de 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona.

En la tabla XX se encuentran los R_F correspondientes.

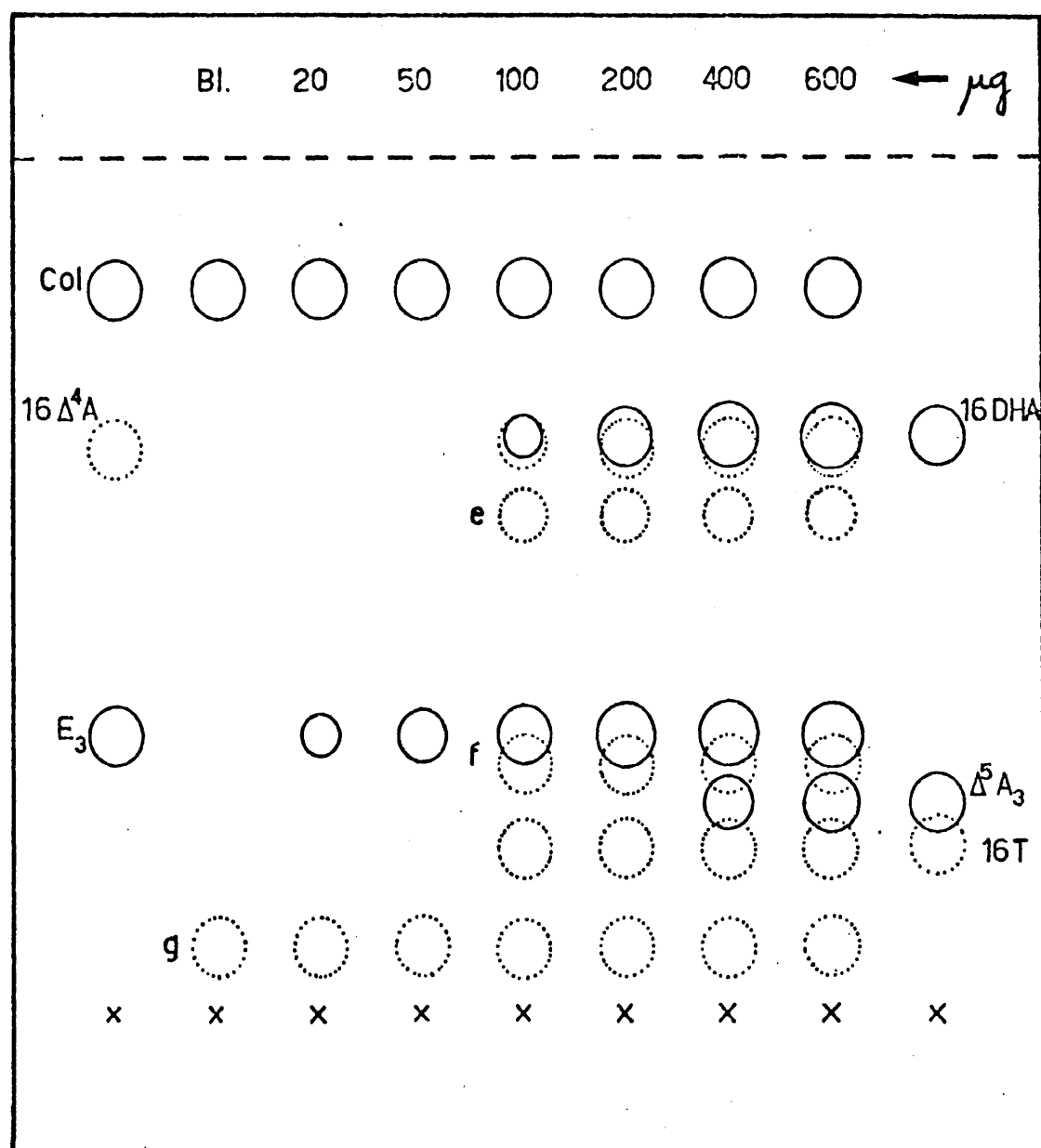


Fig. 50 Incubación de tejido placentario con 16α -OH-DHA

e, f, g \rightarrow No interesan a nuestro estudio

Col \rightarrow colesterol

16DHA \rightarrow 16α -OH-dehidro-
epiandrosterona

E_3 \rightarrow estriol

$\Delta^5\text{A}_3$ \rightarrow androstentriol

16T \rightarrow 16α -hidroxi-
testosterona

4.1.1.4 Examen del residuo de la extracción cloroformo:éter (3:1)

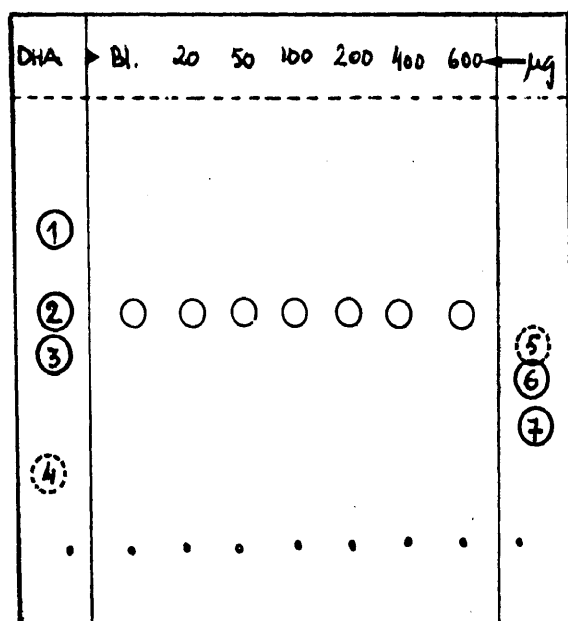
Las figuras 51 y 52 muestran el aspecto de las placas cromatográficas en las que se estudió el residuo de la extracción cloroformo: éter (1:3). En la figura 51 el sustrato era dehidro-epiandrosterona. En la 52, 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona.

4.1.1.5 Determinación de los estrógenos formados en la incubación.

Para la determinación de los estrógenos se siguieron los métodos descritos en el esquema F (pág. 122). Los resultados obtenidos pueden verse a continuación. La Tabla XXI muestra la aromatización de la dehidro-epiandrosterona expresada en μg de estradiol formado/gr tejido plac. en 45 minutos de incubación.

TABLA XXI

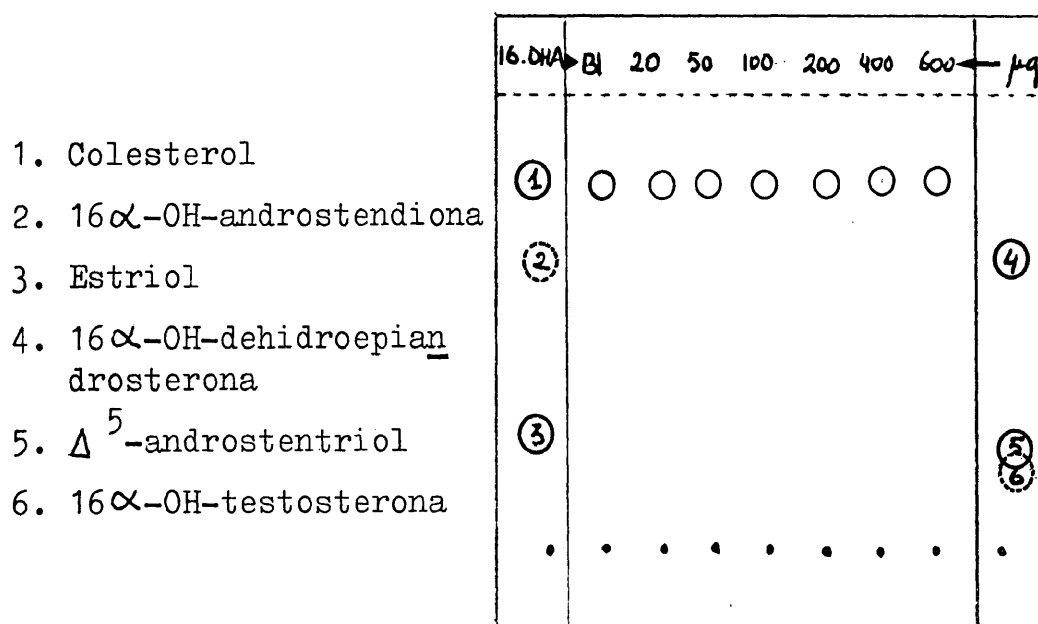
20 μg DHA	1,46 μg E ₂ /gr tej.
50 μg DHA	3,25 μg E ₂ /gr tej.
100 μg DHA	4,02 μg E ₂ /gr tej.
200 μg DHA	4,19 μg E ₂ /gr tej.
400 μg DHA	4,33 μg E ₂ /gr tej.
600 μg DHA	3,23 μg E ₂ /gr tej.



1. Estrona
2. Colesterol
3. Estradiol
4. Testosterona
5. Δ^4 -androstendiona
6. Dehidroepiandrosterona
7. Δ^5 -androstendiol

Fig. 51 Residuo de la extracción éter-cloroformo (3:1).

Fig. 52. Residuo de la extracción éter-cloroformo (3:1)



1. Colesterol
2. 16α -OH-androstendiona
3. Estriol
4. 16α -OH-dehidroepiandrosterona
5. Δ^5 -androstentriol
6. 16α -OH-testosterona

En la figura 53 pueden verse estos datos expresados gráficamente.

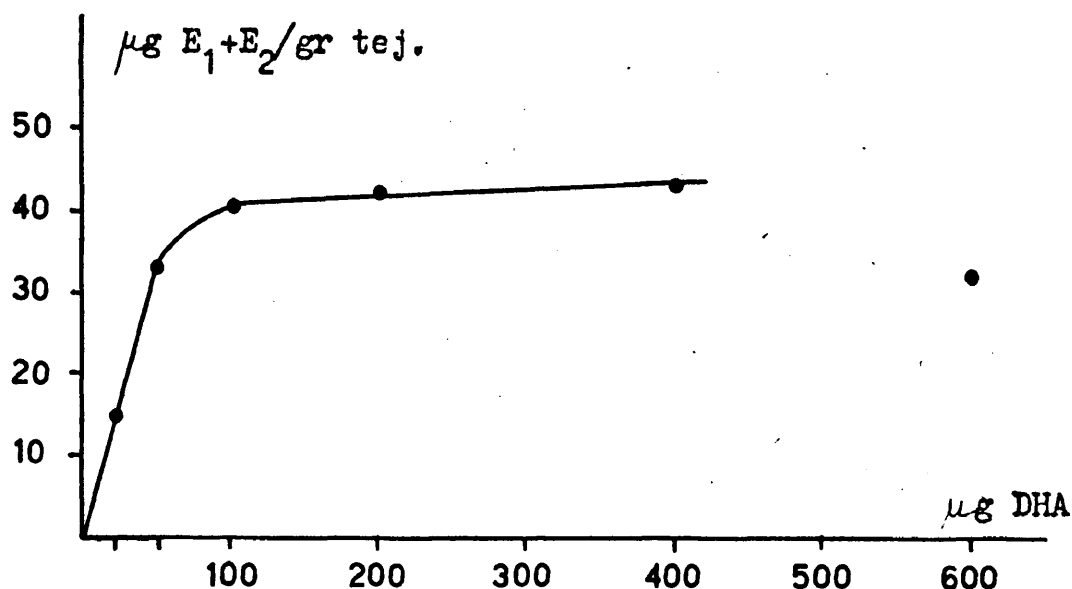


Fig. 53 Aromatización de DHA

La Tabla XXII muestra la aromatización del 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona, expresada en μg de estriol formado/ gr tejido plac. en 45 minutos de incubación.

TABLA XXII

20 μg $16\alpha\text{-OH-DHA}$	\rightarrow	1,4 μg $\text{E}_3/\text{gr tej.}$
50 μg $16\alpha\text{-OH-DHA}$	\rightarrow	-
100 μg $16\alpha\text{-OH-DHA}$	\rightarrow	2,0 μg $\text{E}_3/\text{gr tej.}$
200 μg $16\alpha\text{-OH-DHA}$	\rightarrow	2,0 μg $\text{E}_3/\text{gr tej.}$
400 μg $16\alpha\text{-OH-DHA}$	\rightarrow	1,8 μg $\text{E}_3/\text{gr tej.}$
600 μg $16\alpha\text{-OH-DHA}$	\rightarrow	1,5 μg $\text{E}_3/\text{gr tej.}$

En la figura 54 pueden verse estos datos expresados gráficamente.

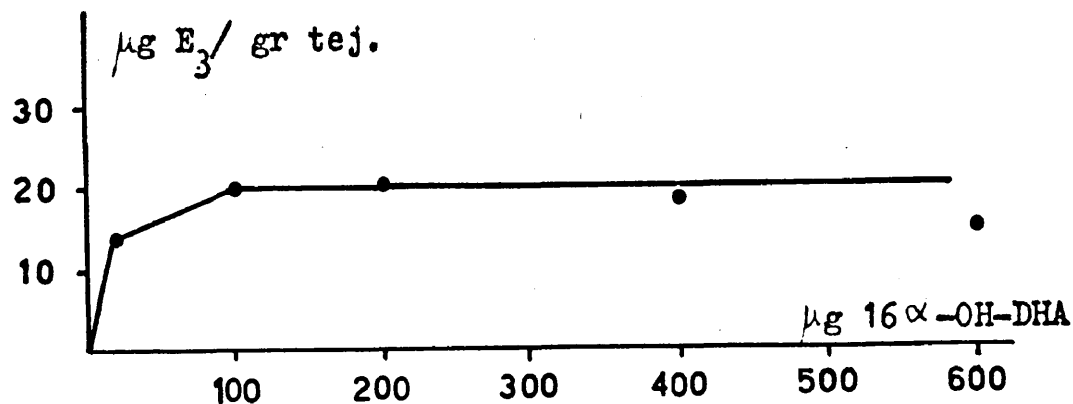


Fig. 54 Aromatización de $16\alpha\text{-OH-DHA}$

4.1.2. Estudio de la reacción de aromatización en función del tiempo de incubación

Para llevar a cabo este estudio se hicieron incubaciones de tejido placentario con dehidro-epiandrosterona y 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona durante tres horas, y se tomaron muestras del incubado en los tiempos que a continuación se indican:

20, 45, 60, 90, 105, 120, 150 y 180 minutos.

4.1.2.1 Material utilizado

Para estos experimentos se utilizaron dos placentas (que llamaremos A y B), provenientes de mujeres que ha-

bían tenido un embarazo y parto completamente normales. Las placentas, desde el punto de vista macroscópico, eran también normales.

La preparación de la $F_{10.000 \times g}$ y la incubación se hicieron inmediatamente después del parto. Todas las operaciones requeridas se realizaron a una temperatura comprendida entre los 0°C y los 4°C y según los métodos ya descritos (Esquemas D, pág. 112; E, pág. 116).

Las placentas, libres del cordón umbilical, membranas y sangre, y preparadas para la trituración, pesaban:

A = 304 gr

B = 240 gr

El volumen del sobrenadante obtenido de la fracción $10.000 \times g$ era:

A = 152 ml

B = 125 ml

Por lo tanto, el contenido del sistema enzimático sería el correspondiente a 2 gr de tejido/1 ml $F_{10.000 \times g}$ y 1,92 gr de tejido/1 ml $F_{10.000 \times g}$ respectivamente.



4.1.2.2 Incubación con dehidro-epiandrosterona y 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona

Se preparan cuatro matraces de incubación de 200 ml con la cantidad de sustrato necesario para sacar un volumen de incubado en cada tiempo, correspondiente a $100 \mu\text{g}$ de sustrato:

- | | |
|-----------------------------|--|
| 1. 900 μg de DHA | 3. 900 μg de $16\alpha\text{-OH-DHA}$ |
| 2. 900 μg de DHA | 4. 900 μg de $16\alpha\text{-OH-DHA}$ |

se llevaron a sequedad con una corriente de nitrógeno.

Se añaden a cada matraz los cofactores correspondientes:

G6P	- 90 mg		en 1,8 ml de Tampón B
NADP	- 45 mg		
G6PDH	- 18 U		en 0,9 ml de Tampón B

Y se tiene 20 minutos en incubadora Dubnoff a 37°C para la generación del NADPH.

Después se añaden 0,3 ml de Tampón B a los matrazes 1 y 3 donde se incubará tejido de la placenta A, y 5,3 ml de Tampón B a los matraces 2 y 4 en los que será incubado el tejido de la placenta B. Así se tienen volúmenes iguales en todos los matraces.

A continuación se añade el tejido placentario:

Placenta A - 45 ml de $F_{10.000}$ x g equivalente a 10 gr de tejido por cada tiempo de incubación.

Placenta B - 40 ml de $F_{10.000}$ x g equivalentes a 8,45 gr de tejido por cada tiempo de incubación.

Se incuban a 37°C durante 30 minutos, en presencia de aire, y en cada tiempo señalado (3:1. 2) se toma una parte del incubado (5,3 ml del matraz correspondiente a la.

placenta A, equivalente a 10 gr de tejido, y 5 ml del matraz correspondiente a la placenta B, equivalente a 8,5 gr de tejido) y se para la reacción con los primeros 10 ml de la mezcla éter/cloroformo (3:1) que utilizaremos para la extracción de los estrógenos formados.

Paralelamente se realiza el experimento con un blanco que no contiene esteroides.

4.1.2.3 Determinación de los estrógenos

La determinación de los estrógenos formados en cada tiempo, se lleva a cabo, como ya se indicó anteriormente, (Esquema F, pág. 122).

La Tabla XXIII (pág. 154) muestra la aromatización de la dehidro-epiandrosterona. Se expresa en μg de estrona + estradiol formado/gr tejido en los distintos tiempos de incubación ensayados.

Las figuras 55 y 56 (págs 155 y 156) expresan gráficamente estos resultados.

La Tabla XXIV (pág. 154) muestra la aromatización del 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona. Se expresa en μg de estriol formado/gr tejido en los distintos tiempos de incubación ensayados.

Las figuras 57 y 58 (págs. 157 y 158) expresan estos resultados gráficamente.

TABLA XXIII AROMATIZACION DEL DEHI
DRO-EPIANDROSTERONA

TABLA XXIV AROMATIZACION DEL 16 α -OH-
DEHIDROEPIANDROSTERONA

t. incub.	$\mu\text{g E}_1 + \text{E}_2$ / gr. tejido		t. incub.	$\mu\text{g E}_3$ / gr tejido	
	Placenta A	Placenta B		Placenta A	Placenta B
20 min	4,65	4,03	20 min	1,14	2,22
45 min	11,11	7,98	45 min	1,98	5,21
60 min	12,81	8,98	60 min	3,44	5,80
90 min	11,18	7,92	90 min	5,07	5,56
105 min	-	8,52	105 min	5,67	5,79
120 min	11,31	9,84	120 min	5,50	6,00
150 min	-	8,37	150 min	6,51	5,00
180 min	-	7,07	180 min	5,27	5,21

Fig 55 Placenta A. Incubación con DHA

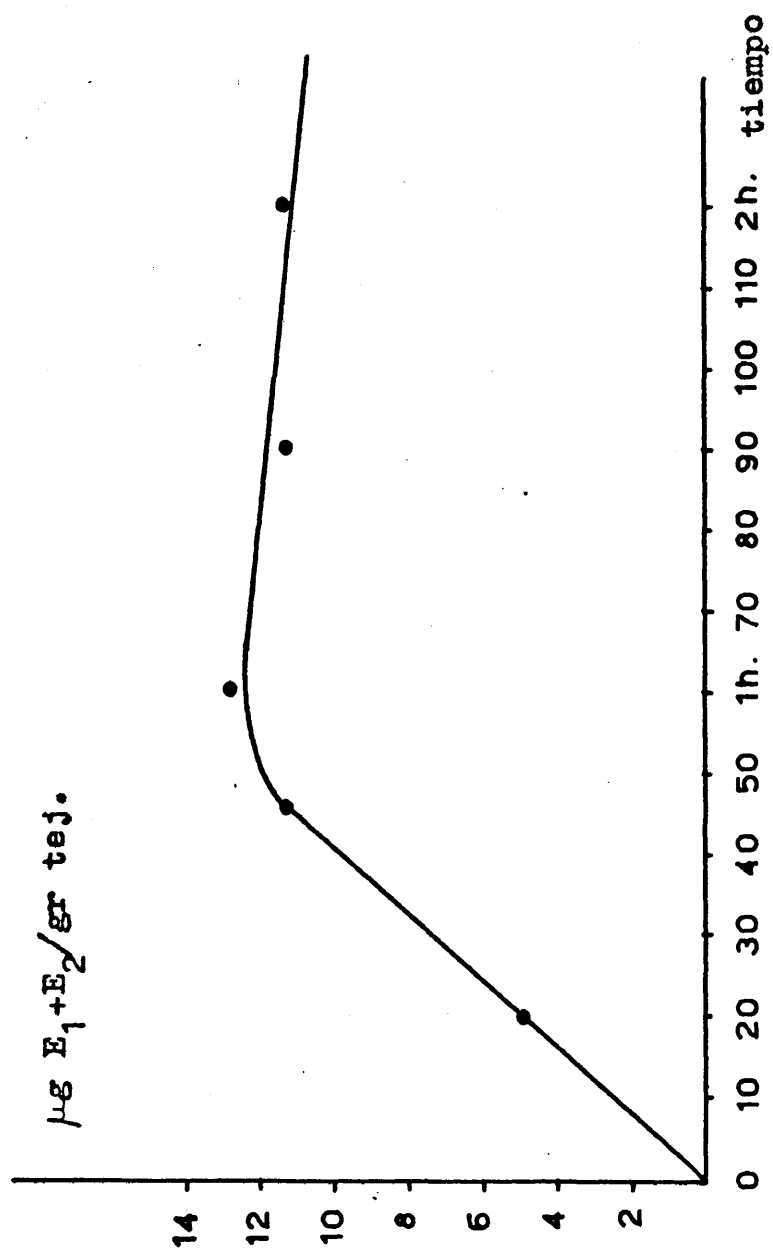


Fig 56 Placenta B. Incubación con DHA

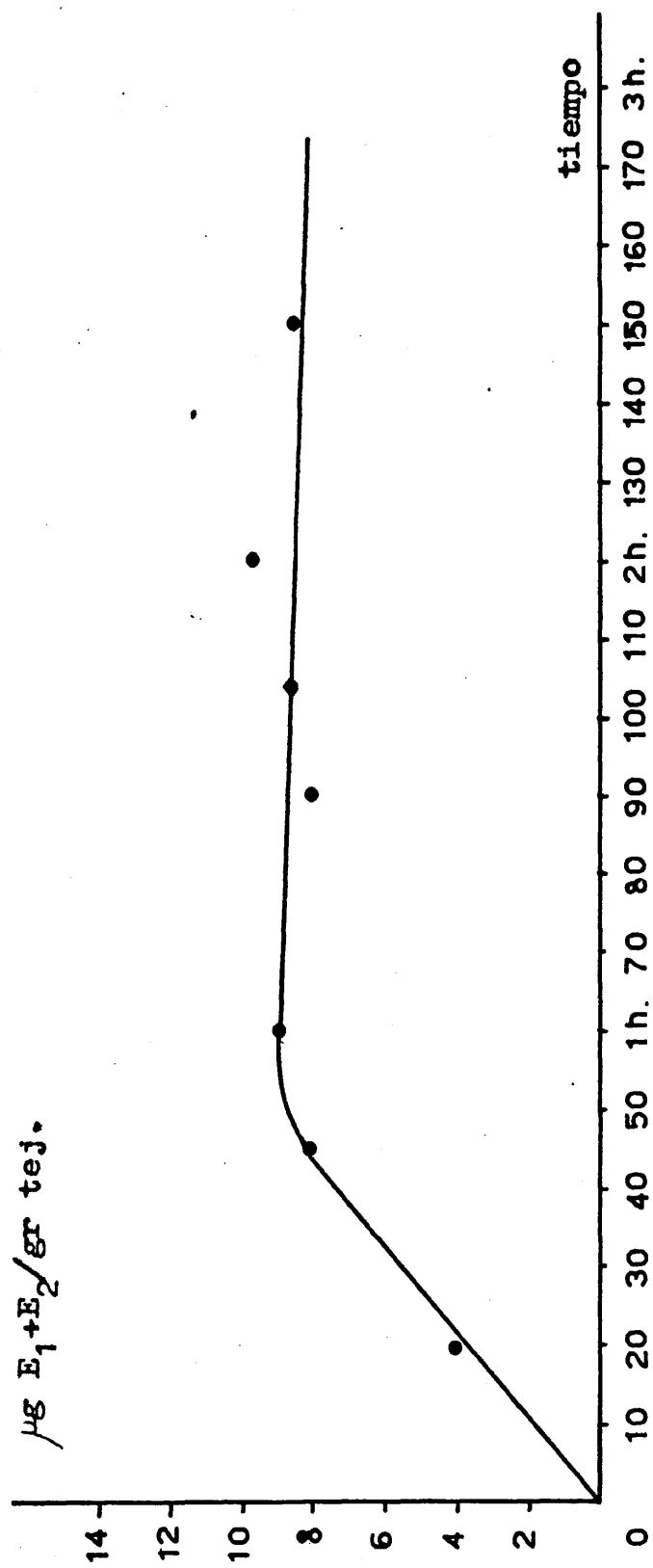


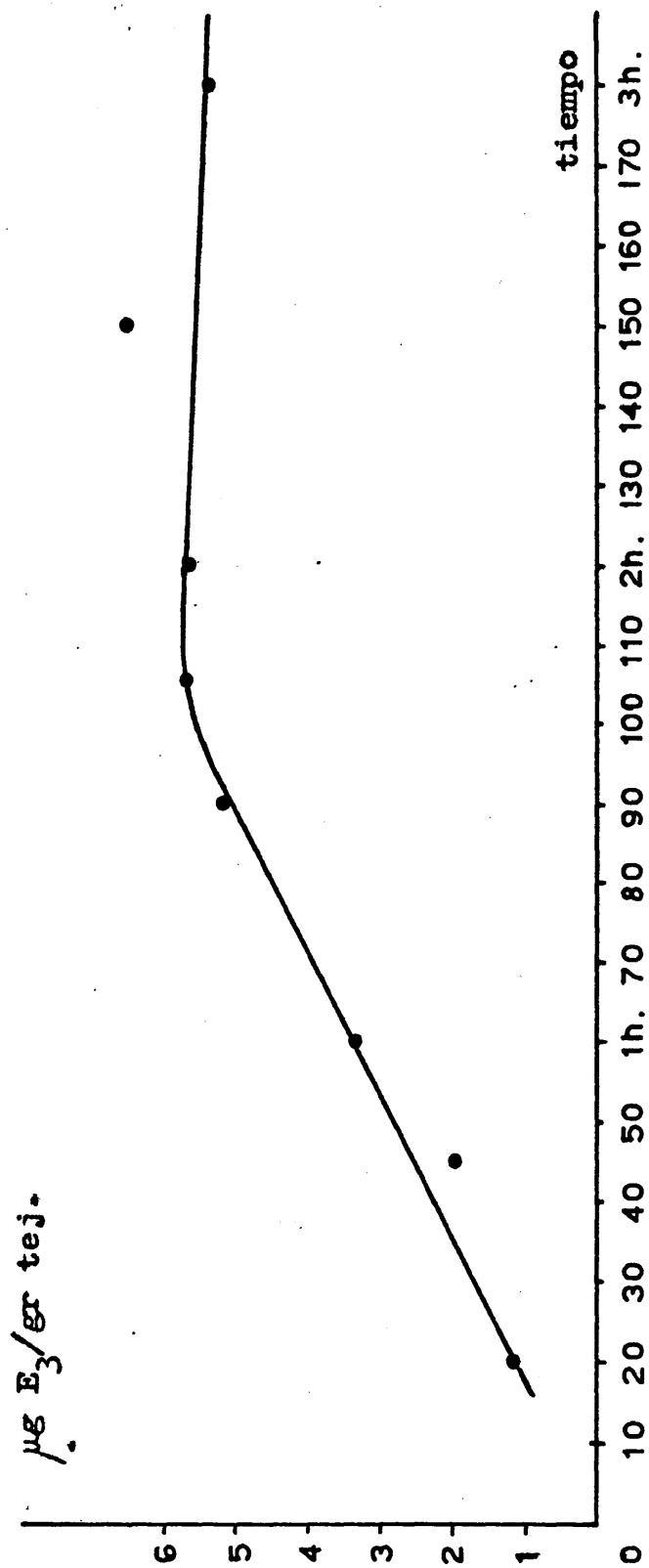
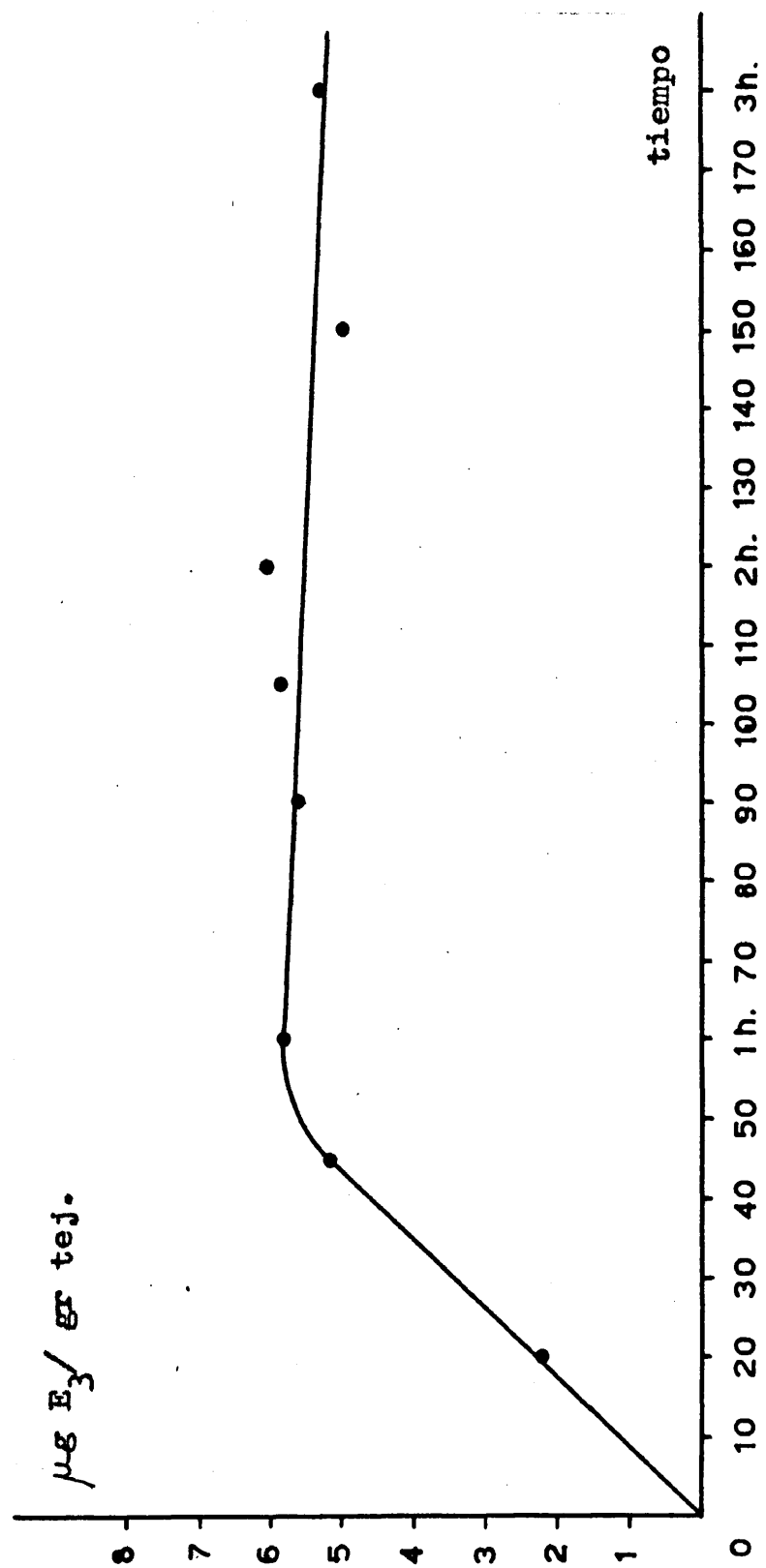
Fig. 57 Placenta A. Incubación con 16α -OH-DHA

Fig. 58 Placenta B. Incubación con 16α -OH-DHA

4.1.3 Interpretación de los resultados

Los experimentos descritos anteriormente nos permiten establecer unas condiciones patrón, óptimas para realizar "in vitro" la incubación de sustratos esteroideos -de hidroepiandrosterona, 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona- con fracción 10.000 x g de tejido placentario.

Los parámetros estudiados fueron dos: la cantidad de sustrato y el tiempo de incubación.

Las Tablas XXI y XXII, (Págs. 147 y 149) y las figuras 53 y 54 (págs. 149 y 150) nos ponen de manifiesto cómo la cantidad de estrógenos formados en la incubación, incrementa proporcionalmente a la cantidad de sustrato incubado mientras nos mantenemos entre 20 y 100 μ g. A partir de 100 μ g, aunque sigamos incrementando la cantidad de sustrato, no aumenta ya la cantidad de estrógenos formados. Quiere decir que la capacidad aromatizante de la placenta tiene un límite; parece ser que llega un momento en que se da una saturación del sistema aromatizante que imposibilita la reacción.

Cuando se sobrepasan los 400 μ g de sustrato, parece sentirse una inhibición de esta capacidad aromatizante, pues en los valores obtenidos después de este nivel de sus-

trato se observó una tendencia al descenso en la producción de estrógenos. Esta tendencia podría deberse a la formación de productos hidroxí-derivados de los estrógenos (6-OH y 2-OH) no detectables con los métodos utilizados. La comprobación de este hecho podría ser de interés para futuras investigaciones.

Se ha hecho después un estudio cualitativo de la desaparición del sustrato, Fig. 49 y 50 (Págs. 144 y 146), y se ha comprobado que cuando se ponen cantidades de sustrato comprendidas entre 20 μ g y 100 μ g, hay una conversión total del sustrato en estrógenos, mientras que cuando se sobrepasa esta cantidad, comenzamos a detectar sustrato no consumido y también, esteroides precursores a distintos niveles, que no llegan a ser convertidos en estrógenos.

La cantidad de estos esteroides aumenta a medida que seguimos aumentando la cantidad de sustrato incubado.

Estas observaciones son válidas tanto para las incubaciones con dehidro-epiandrosterona como para las incubaciones con 16 α -hidroxí-dehidroepiandrosterona.

De la misma manera en las Tablas XXIII y XXIV, (pág. 154) y las figuras 55 y 58 (pág. 155 y 158), vemos que la formación de estrógenos aumenta de modo proporcional al tiempo de incubación mientras nos mantenemos en tiempos comprendidos entre 45-60 minutos aproximadamente. Sobrepasando estos tiempos, los valores de estrógenos formados, se estabilizan, y después de dos horas de incubación parece que tienden a disminuir.

También aquí el proceso es el mismo para el caso de la dehidroepiandrosterona que para la 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona.

Los valores obtenidos para incubaciones con dehidro-epiandrosterona y 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona, coinciden prácticamente con los resultados obtenidos por Ryan, 1959, (82) haciendo incubaciones con androstendiona.

En este apartado se hizo además un estudio para comprobar que en la extracción éter:cloroformo (3:1) no se perdía ningún esteroide. Para ello se analizó, mediante cromatografía sobre capa fina, el residuo de la extracción. Las figuras 51 y 52 (pág. 148), que muestran los resultados obtenidos, nos dicen que no quedan cantidades detectables de estrógenos en dicho residuo.

4.2 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA PLACENTA EN RELACION CON LA PRODUCCION DE ESTROGENOS

En las experiencias que se describen a continuación hemos estudiado la biosíntesis de los estrógenos "in vitro", incubando preparaciones de tejido placentario proveniente de placentas normales y patológicas con sustratos esteroides de 19 átomos de carbono, ya que sabemos que éstos son compuestos intermedios en las vías biosintéticas para la producción de los estrógenos.

Con estas experiencias nos proponemos investigar si se pueden detectar deficiencias enzimáticas (de una o varias enzimas), y qué relación tienen estas deficiencias con la marcha general de la aromatización en la placenta.

Para ello se llevaron a cabo los siguientes grupos de experiencias:

1. Estudio de la aromatización en un grupo de placentas normales.
2. Estudio de la aromatización en un grupo de placentas con insuficiencia placentaria. Relación entre actividad aromatizante y sulfatásica en este grupo.

po de placentas.

3. Estudio de la aromatización en un grupo de placentas patológicas: fetos anancefálicos, toxemias y anemia hipocrómica.

3.2.1 Aromatización en un grupo de placentas normales

Entendemos por placentas normales, las provenientes de pacientes que no han sufrido ninguna enfermedad durante el embarazo, que condujeron una gestación y parto normales y que, recogidas inmediatamente después del parto, presentaban un aspecto macroscópicamente normal.

El tejido placentario en todos los casos, se preparó como se ha descrito en el Esquema D (pág. 112).

3.2.1.1 Material utilizado

Para este grupo de experiencias se ha utilizado la fracción 10.000 x g y también la fracción de los microsomas de 13 placentas. La incubación de las dos fracciones se hizo por separado resultando un total de 26 incubaciones, dado que la amplitud y larga duración de cada experimento no permite hacer conjuntamente la incubación de las dos fracciones.

Los sustratos utilizados en este grupo de experiencias han sido los siguientes:

Dehidro-epiandrosterona
 19-hidroxi-dehidroepiandrosterona
 Dehidro-epiandrosterona-sulfato
 Androstendiol
 19-hidroxi-androstendiol
 Androstendiol-sulfato
 Androstendiona
 19-hidroxi-androstendiona
 Testosterona
 19-hidroxi-testosterona
 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona
 16 α -hidroxi-androstendiona
 16 α -hidroxi-testosterona

(Nombres sistemáticos pág. 84).

Como es obvio no se han utilizado todos los sustratos en todas las incubaciones por la imposibilidad de llevar adelante, bajo las mismas condiciones, una cantidad de material que se sale fuera de las posibilidades de manejo. Por el mismo motivo no han podido hacerse los experimentos por duplicado.

El análisis de los estrógenos formados en la incubación se hizo según los métodos ampliamente descritos y de los que puede verse un resumen en el Esquema F (pág.122)

4.2.1.2 Valores medios obtenidos

Las dos Tablas que se presentan a continuación

muestran los resultados de la producción de estrógenos en las distintas incubaciones.

TABLA XXV (pág. 166): Cantidad de estrógenos producidos en las incubaciones de varios sustratos esteroides de 19 átomos de carbono con fracción 10.000 x g. La unidad en que se expresan estos datos es en nano-moles de estrógenos formados/gr de tejido en 45 minutos de incubación.

TABLA XXVI (pág. 167): Cantidad de estrógenos producidos en las incubaciones de varios sustratos esteroides de 19 átomos de carbono con fracción de microsomas. La unidad en que se expresan es la misma que en la Tabla XXV.

En la Figura 59 (pág. 168) están expresadas claramente estas variaciones.

Se han calculado las medias y las desviaciones standard que nos ponen de manifiesto estas oscilaciones para el grupo de placentas normales estudiadas. Nos servirán como punto de referencia para establecer a qué nivel está la capacidad aromatizante de las placentas con insuficiencias y las patológicas.

TABLA XXV ESTROGENOS PRODUCIDOS EN INCUBACIONES DE $10.000 \times g$ DE TEJIDO PLACENTARIO CON SUSTRATOS ESTEROIDES

Pac. nº	D	19D	DS	$\Delta^5 A_2$	$19\Delta^5 A_2$	$\Delta^5 A_2 S$	A	19A	T	19T	16D	16A	16T
1							4,1	10,6				3,2	
2							6,4				3,3	3,5	0,9
3											8,5	9,9	4,8
4											13,1	12,5	
5	4,9												
6			8,7										
7											7,7	8,7	5,7
8											6,1	6,2	1,9
9	4,7	3,0	6,7				3,9	12,9	8,8	10,6	7,0	3,2	3,7
10	8,7	10,9	9,1				8,7	13,1				8,9	
11	18,0		7,9	10,7		4,9							
12	12,6	12,6	10,2	9,5	9,7								
13	11,8	12,6	8,6	8,1	9,8	7,4							
M \pm SD	10,1 \pm	9,7 \pm	8,5 \pm	9,4 \pm	9,7 \pm	6,2 \pm	7,4 \pm	12,2 \pm	8,8	10,6	7,6 \pm	6,9 \pm	3,4 \pm
	5,0	4,5	1,1	1,3	0,1	1,7	3,1	1,4			3,2	3,5	1,9

Todos los datos están expresados en nano-moles de estrógenos formados/ gr tej. en 45 min. de incubación.

Abreviaturas pág. XI

TABLA XXVI ESTROGENOS PRODUCIDOS EN INCUBACIONES DE MICROSOMAS DE TEJIDO PLACENTARIO CON SUSTRATOS ESTEROIDES

Pac.nº	D	19D	DS	$\Delta^5 A_2$	19 $\Delta^5 A_2$	$\Delta^5 A_2 S$	A	19A	T	19T	16D	16A	16T
1							1,8	5,3				1,5	
2							2,1						1,1
4											2,6	2,6	
5	1,5										1,9		
6	5,7	5,5	11,7				11,8	19,1	9,1	12,6	2,1	2,5	6,2
7	6,9	4,6	6,7				11,4	20,3	11,3	18,5	3,1	4,3	4,6
8	4,6	4,7	4,6				6,6	11,8	7,5	12,0	3,6	4,0	3,7
11	8,3		8,1	6,9		7,1							
12	7,2	8,1	7,7	5,7	4,8	7,0							
13	6,5	6,9	6,6	5,1	5,0	6,0							
M \pm SD	5,8 \pm	5,9 \pm	7,6 \pm	5,9 \pm	4,9 \pm	6,7 \pm	6,6 \pm		9,2 \pm		2,3 \pm	2,6 \pm	3,9 \pm
	2,2	1,5	2,4	1,0	0,2	0,6	4,6		1,8		1,1	1,5	2,1

Todos los datos están expresados en nano-moles de estrógenos formados / gr tej. en 45 min. de incubación.

Abreviaturas pág. xi

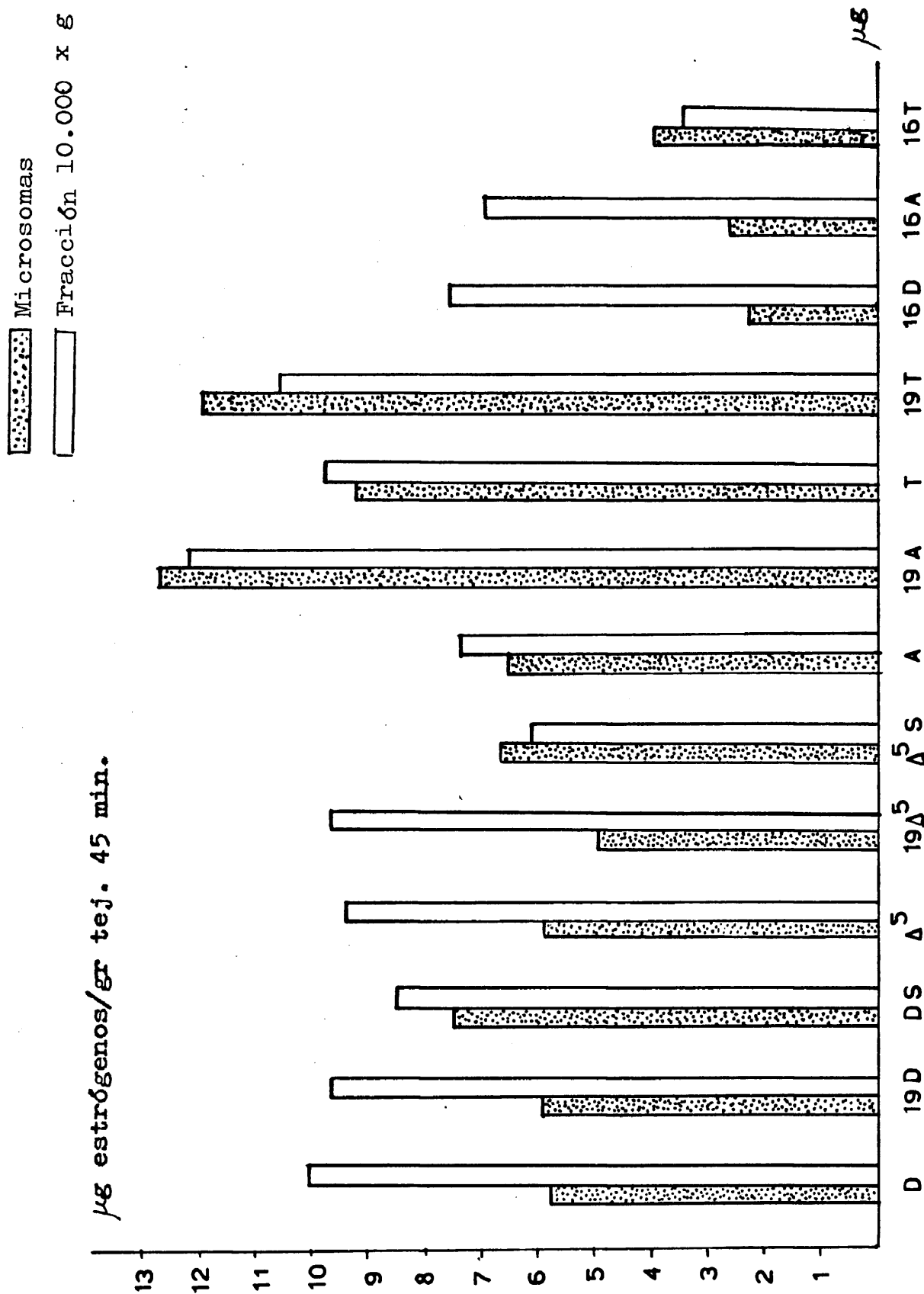


Fig. 59

4.2.2 Interpretación de los resultados

De la observación de la figura 59 (pág. 168) que recoge los datos de las Tablas XXV y XXVI (pág. 166 y 167), podemos deducir en primer lugar, que existe una gran variabilidad en la capacidad aromatizante de unas placentas con respecto a otras. Y también, que aún dentro de cada placenta se observan grandes variaciones según los sustratos utilizados.

Así, los 19-hidroxi-esteroides (y especialmente el 19-hidroxi-androstendiona y el 19-hidroxi-testosterona), muestran valores más altos que los desoxi-esteroides correspondientes (androstendiona y testosterona), pareciendo indicar que son precursores más próximos en la cadena de compuestos que conducen a la formación de estrógenos.

Los 16 α -hidroxi-esteroides precursores del estríol, permanecen a un nivel de aromatización más bajo que el que cabría esperar; quizá porque falte en el medio de incubación alguna condición favorable para la aromatización de este grupo de compuestos. Sería éste otro punto interesante de aclarar en estudios posteriores.

Estudiando comparativamente las dos Tablas antes

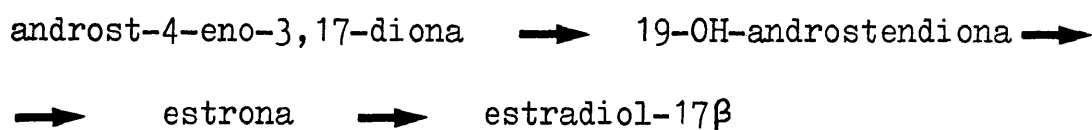
mencionadas, vemos que en líneas generales la fracción 10.000 x g aromatiza más que la fracción de los microsomas; probablemente porque en las operaciones que conducen a la preparación de los microsomas hay pérdida parcial de la actividad enzimática.

De lo anteriormente expuesto se desprende que es difícil interpretar en términos absolutos la capacidad aromatizante de la placenta, y mucho más, por tanto, establecer el límite entre normalidad y patología, valiéndose de estos parámetros.

Por eso es necesario interpretar estos resultados y utilizarlos como una información de la línea de comportamiento más que como términos de comparación absolutos. Aunque resulta evidente, como veremos más adelante, que se puede establecer un "cierto nivel" de aromatización de las placentas normales, que no es alcanzado en la mayoría de los casos, por los valores obtenidos en incubaciones hechas con placentas clasificadas como patológicas desde el punto de vista médico (insuficiencias placentarias, fetos anencefálicos, etc.).

4.2.3 Cinética de la transformación de los 16 α -hidroxi-esteroides

En 1967, Menini y Engel (114) demostraron por medio de estudios cinéticos que en la placenta humana los desoxi-estrógenos se sintetizan a través de la siguiente vía:



En 1969, Fahamy y col., (115) comprobaron que es tas vías biosintéticas operaban en el cuerpo lúteo.

En los últimos años se ha demostrado repetidamente (116) que durante el embarazo la 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona producida por el feto, es el principal precursor del estriol que se forma en la placenta. Sin embargo se desconoce la secuencia de las reacciones implicadas en el paso de 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona a estriol.

4.2.3.1 Material utilizado

A continuación se presentan los resultados de al gunos experimentos referentes a la aromatización de los 16 α -hidroxi-esteroides de la serie del androstano en fracciones microsómicas del tejido placentario humano.

La preparación (Esquema D, pág. 112), incubación (Esquema E, pág. 116) y análisis de los esteroides (Esquema F, pág. 122) se hicieron según los procedimientos des critos en el apartado correspondiente de Métodos.

4.2.3.2 Conversión de 16 α -hidroxi-testosterona y 16 α -hidroxi-androstendiona en estriol

La figura 60 muestra la conversión de 16 α -hidroxi-testosterona en estriol. En éste y otros experimentos aná

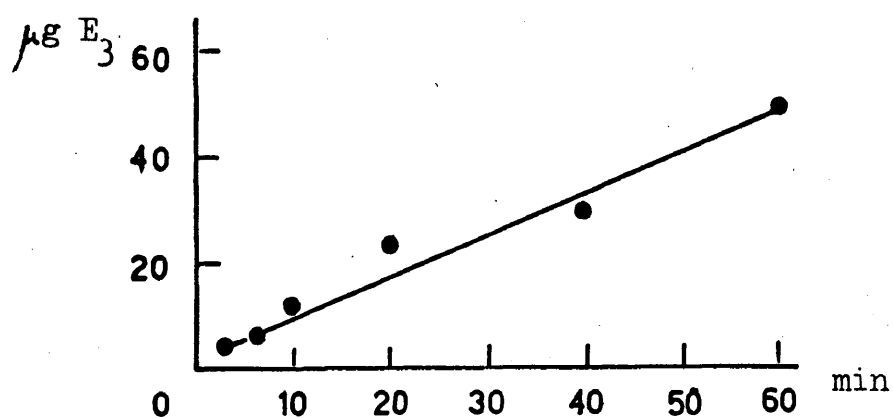


Fig. 60 Conversión de 16α -OH-T en E_3

logos no se han podido poner en evidencia más compuestos que el estriol.

En la figura 61 podemos ver la formación de estriol a partir de 16α -hidroxi-androstendiona.

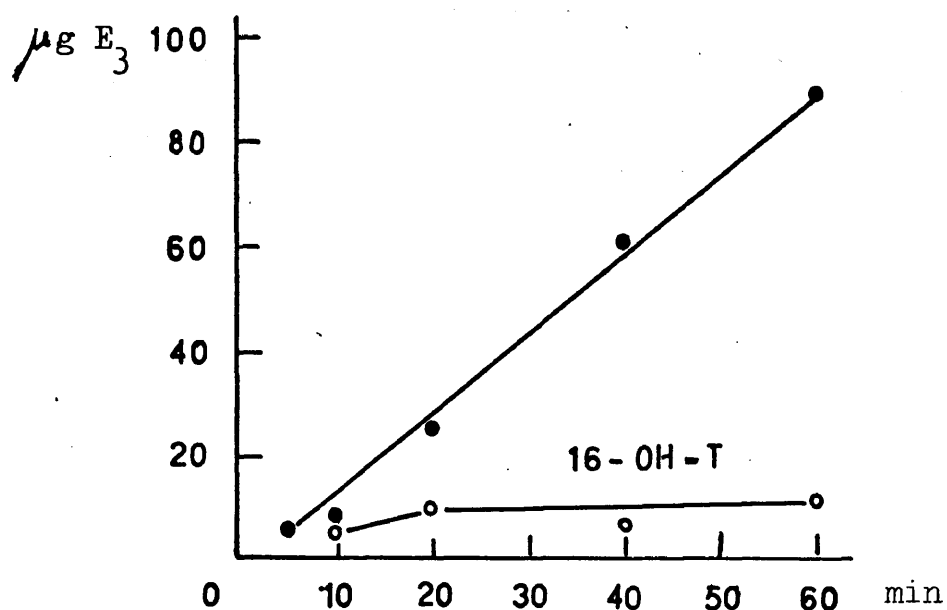


Fig. 61 Conversión de 16α -OH-A en E_3

El nivel de estriol formado a partir de este compuesto es dos veces más alto que el obtenido utilizando como sustrato precursor 16α -hidroxi-testosterona. Además, durante la aromatización de 16α -hidroxi-androstendiona se pueden detectar pequeñas cantidades de 16α -hidroxi-testos-terona en todas las incubaciones, después de los 10 prime-ros minutos.

4.2.3.3. Conversión de 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona en estriol

En la Tabla XXVII pueden verse los resultados obtenidos en una incubación típica de 16α -hidroxi-dehidroepi-androsterona.

TABLA XXVII PRODUCTOS FORMADOS DURANTE LA INCUBACION DE
 16α -OH-DHA

10 min	16α -hidroxi-androstendiona 16α -hidroxi-estriol compuesto desconocido (abs. U.V. 254 nm)								
60 min	<table> <tr> <td>16α-hidroxi-androstendiona</td><td>16,5 n mol</td></tr> <tr> <td>andostentriol</td><td>107,0 n mol</td></tr> <tr> <td>estriol</td><td>74,9 n mol</td></tr> <tr> <td>16α-hidroxi-testosterona</td><td>14,2 n mol</td></tr> </table>	16α -hidroxi-androstendiona	16,5 n mol	andostentriol	107,0 n mol	estriol	74,9 n mol	16α -hidroxi-testosterona	14,2 n mol
16α -hidroxi-androstendiona	16,5 n mol								
andostentriol	107,0 n mol								
estriol	74,9 n mol								
16α -hidroxi-testosterona	14,2 n mol								

En varios experimentos en que se incubó 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona, con la fracción microsómica del tejido placentario, se observó la formación de androstentriol (androst-5-eno- 3β - 16α , 17β -triol) y también pequeñas cantidades de estriol.

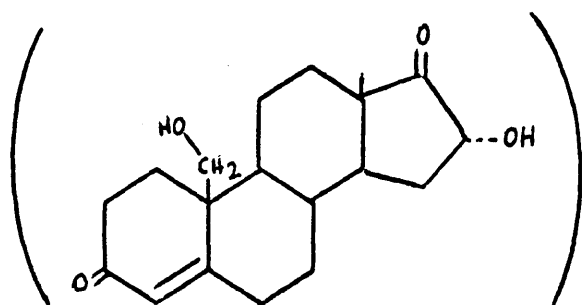
En las fases iniciales de la reacción se detectaba con frecuencia 16α -hidroxi-androstendiona y alguna vez 16α -hidroxi-estrona.

4.2.3.4 Identificación de un 16α , 19 -dihidroxiandrost-4-eno- $3,17$ -diona precursor de estriol

Además de los compuestos arriba mencionados, aparece otro, que no estaba presente en el blanco de tejido y que presentaba absorción a la luz ultravioleta (254 nm).

Como puede verse en la figura 62 la movilidad cromatográfica del compuesto desconocido es semejante a la calculada para el esteroide 16α , 19 -dihidroxiandrost-4-eno- $3,17$ -diona, compuesto, que teniendo en cuenta los conocimientos acerca de la aromatización del anillo A de las moléculas esteroidicas, podría muy bien ser un compuesto intermedio para la producción de estriol.

Después de aislar este compuesto desconocido a partir de la mezcla de incubación, mediante cromatografía sobre capa fina (2.4.1) y de incubado con microsomas placentarios, se vio que se obtenía un compuesto que parecía ser semejante al estriol.

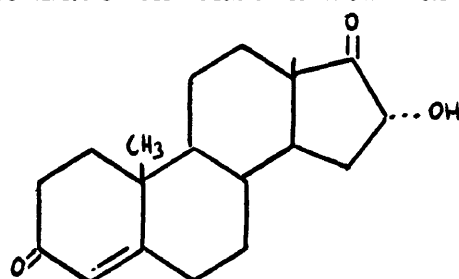


"CPE₃" → compuesto precursor de estriol

Fig. 62

Características

- 1) TLC en sistema cloroformo:etanol (9:1) → $R_F = \underline{0,44}$
 R_F calculado en base a los valores R_M de:



y suponiendo que el compuesto desconocido tiene



- 2) Incubado con microsomas placentarios, NADPH y O₂ da estriol, determinado con la reacción de Kober y sobre el extracto purificado según Brown.
- 3) El t_R del estriol obtenido a partir de incubaciones de "CPE₃" en gas-cromatografía (1,5% OV-1 ; 225°) como 3-metil-éter-16 α ,17 β -diacetato es de 21,7 min; igual que el del estriol-3-metil-éter-16 α ,17 β -diacetato patrón

Se caracterizó como un compuesto metilado en 3, después de la metilación, columna de alúmina y reacción de Kober ($\lambda_{\text{max}}=517 \text{ nm}$) (108). Una porción de este compuesto metilado en 3 se acetiló (117) y analizó mediante gas-cromatografía (3.4). En el cromatograma apareció un pico con un tiempo de retención de 21,7 minutos (ver las condiciones en la figura 62), idéntico a la del estriol-3-metil-16 α ,17 β -diacetato.

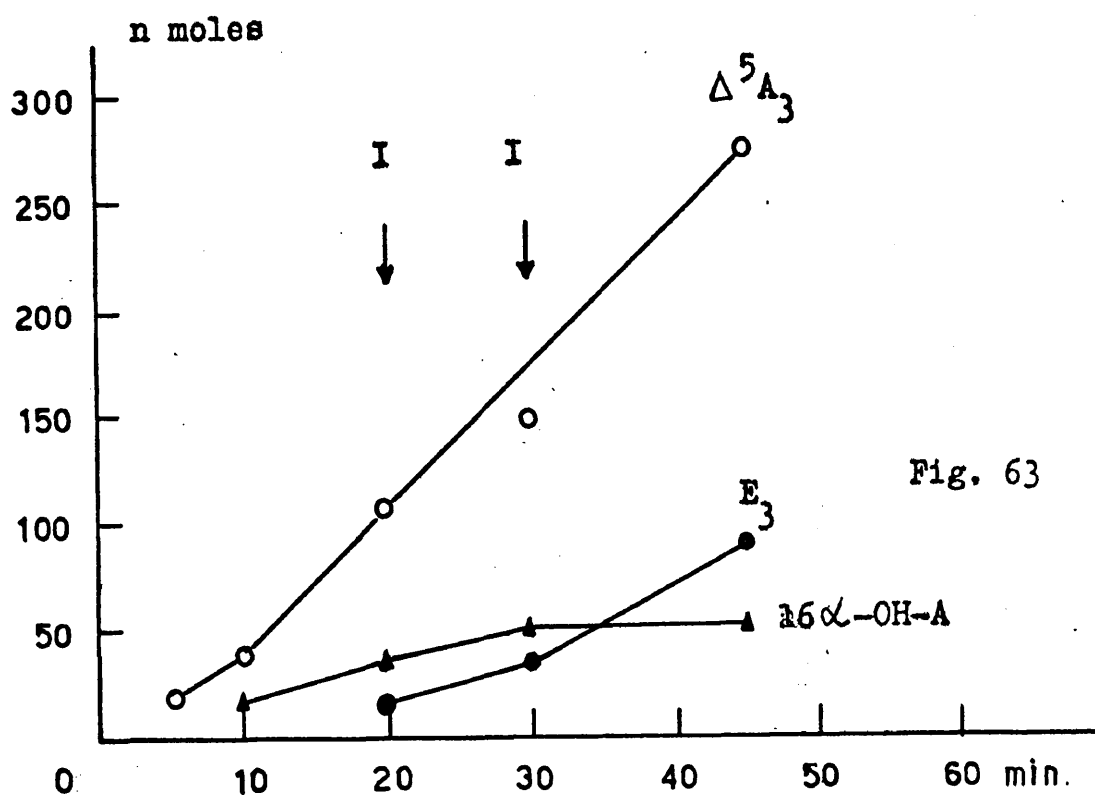


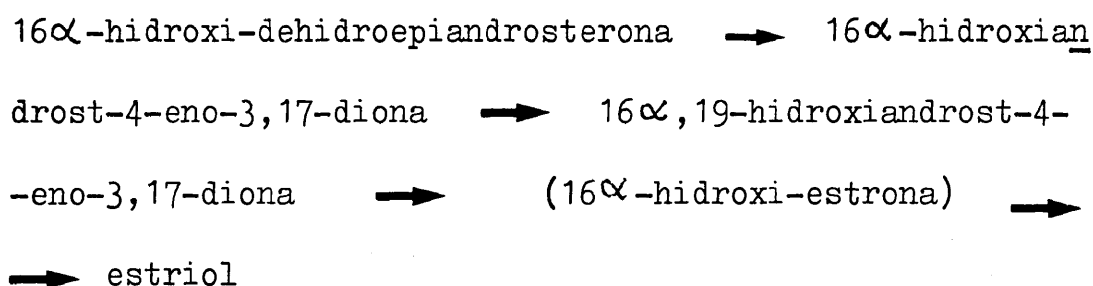
Fig. 63

En esta figura 63 puede verse la gráfica que representa la conversión de 16 α -hidroxi-androstendiona en estriol con los productos intermedios que han podido detectarse y medirse.

En este experimento, el compuesto intermedio pos tulado $16\alpha,19$ -dihidroxiandrost-4-eno-3,17-diona (I) se de- tectaba en las muestras tomadas a los 20 y 30 minutos de in cubación. El estriol comenzaba ya a medirse a los 20 minu- tos de incubación.

4.2.4 Interpretación de los resultados

Los resultados de este estudio están de acuerdo con la hipótesis de que en la placenta el estriol se forma a partir del 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona y a través de la siguiente secuencia de compuestos:



El hecho de que el 16α -hidroxi-estrona (probablemente el precursor inmediato del estriol), no pueda detectarse normalmente o se encuentre en pequeñísimas cantidades, puede explicarse fácilmente conociendo el alto nivel de conversión de 16α -hidroxi-estrona en estradiol, en incubaciones de tejido placentario a las que se añadía un sistema generador de NADPH.

En un experimento en que se incubaron $100\ \mu\text{g}$ de 16α -hidroxi-estrona, bajo las condiciones patrón, se encontró que al cabo de 2 minutos, solamente $5,5\ \mu\text{g}$ del sustrato

quedaba sin haber sido transformado; el resto podía identificarse ya como estriol. Esto supone una conversión de 16,0 n mol de sustrato por gr de tejido en un minuto.

Por lo tanto, el presente estudio, parece poner de manifiesto que la $16\alpha,19$ -dihidroxiandrost-4-eno-3,17-diona, es un compuesto intermedio en la conversión de la 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona en estriol.

En este proceso la 16α -hidroxi-androstendiona aparece como el primer producto de la transformación de la 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona y la 16α -hidroxi-estrona, el precursor inmediato del estriol.

Tanto la 16α -hidroxi-testosterona como la 16α -hidroxi-androstendiona pueden transformarse en estriol; pero se ha visto que la capacidad de la primera para ser aromatizada, es aproximadamente la mitad que la de la segunda.

Esto, junto con otros estudios precedentes, (114) sugiere que la 19-hidroxilación, reacción obligatoria para la aromatización del anillo A de los esteroides, tiene lugar preferentemente en sustratos que tienen un grupo oxo en posición 17.

4.2.5 Aromatización en casos de insuficiencia placentaria

Entendemos por placentas con insuficiencia placentaria las provenientes de pacientes con una excreción de estriol en orina, inferior a 10 mg en 24 horas, durante el último mes del embarazo.

4.2.5.1 Material utilizado

Para este grupo de experiencias se utilizó únicamente la F_{10.000} x g que fue preparada como se describe en el Esquema D (pág. 112). Se hicieron por lo tanto 14 incubaciones (Esquema E, pág. 116) con los siguientes sustratos:

Dehidro-epiandrosterona

Dehidro-epiandrosterona-sulfato

Androstendiona

16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona

16 α -hidroxi-androstendiona

En tres de las incubaciones se pusieron también androstendiol y androstendiol-sulfato. El análisis de los estrógenos formados en las incubaciones se hizo como se ha indicado anteriormente en el Esquema F (pág. 122).

4.2.5.2 Valores obtenidos y relación con los valores de placentas normales.

Los resultados pueden verse en la Tabla XXVIII.

TABLA XXVIII PRODUCCION DE ESTROGENOS EN INCUBACIONES DE F_{10.000} x g
PROVENIENTES DE INSUFICIENCIAS PLACENTARIAS

Pac.nº	D	DS	A	Δ^5A_2	Δ^5A_2S	16D	16A
14	2,14	5,26	5,64			10,53	11,06
15	3,05	1,71	2,66			1,46	1,85
16	3,26	2,63	2,56			2,95	2,59
17	3,47	3,01	3,22			0,63	0
18	0	0	0				0
19a	5,29	0	9,54			4,53	6,62
19b	4,14	0,42	3,92	3,43	2,24	2,45	3,29
20	0,24	0,24	0,17	0,07	0		0
21	1,36	1,33	1,22			0,73	0,93
22	0,80	0,84	0,94	0,77	0,52	0,29	0,46
23	1,36	1,33	2,35			0,89	0,91
24	0,70	0,63 -	0,70			0,59	0,83
25	0,90	0,87	0,20			1,09	0,56
26	1,26	1,26	1,61			0,66	0,26

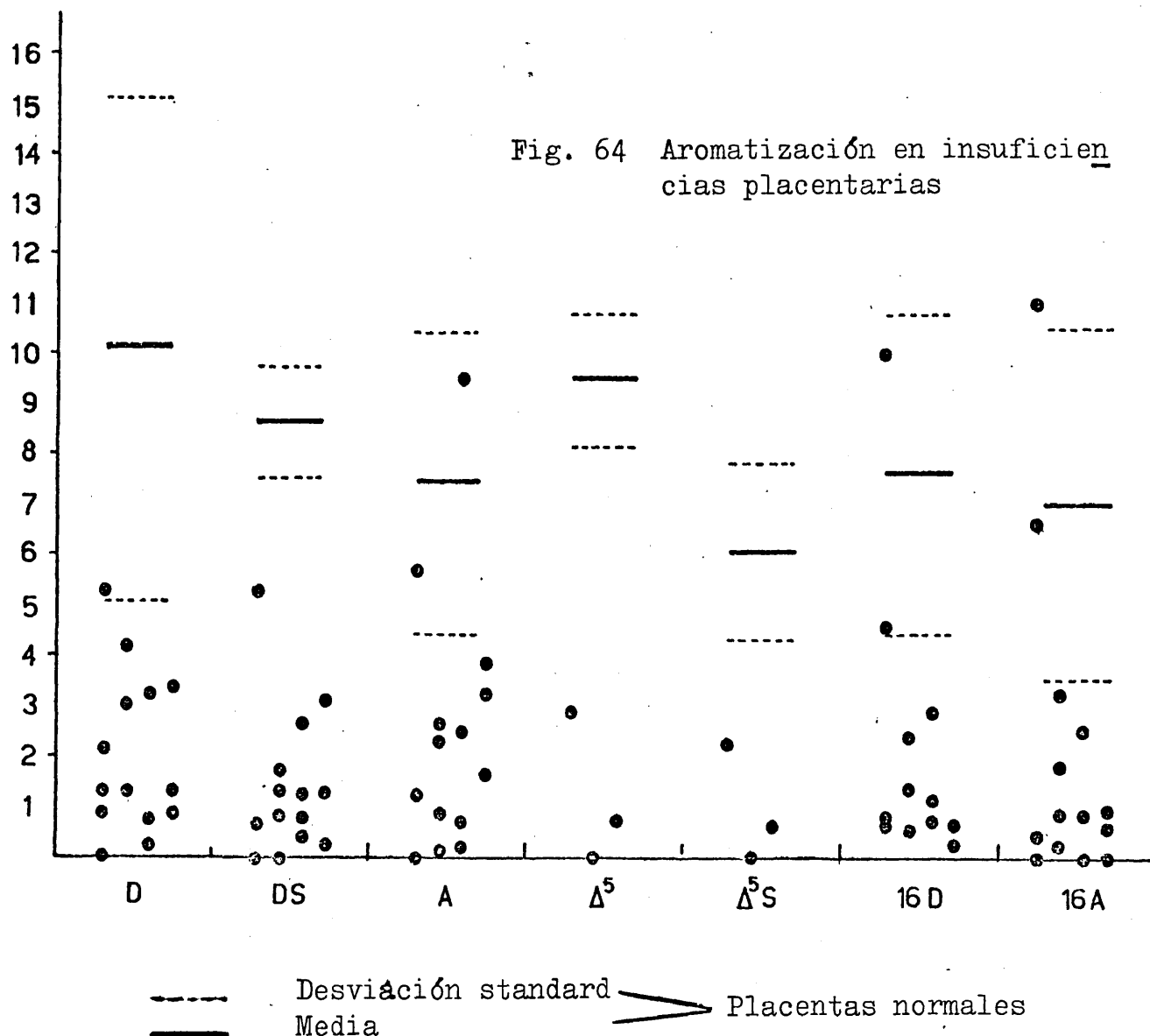
Todos los datos están expresados en nano-moles de estrogénos formados/gr
tejido incubado en 45 min.

Abreviaturas pág. XI

La figura 64 muestra gráficamente estos datos y los valores medios obtenidos en un grupo de placentas normales.

D — dehidro-epiandrosterona	Δ^5 S — androstendiol sulfato
DS — dehidro-epiandrosterona-sulfato	16D — 16 α -OH-dehidroepiandrosterona
A — Androstendiona	16A — 16 α -OH-androstendiona
Δ^5 — Androstendiol	

Fig. 64 Aromatización en insuficiencias placentarias



4.2.6 Interpretación de los resultados

También en este caso observamos, al estudiar la aromatización del grupo de placentas normales, que existe una gran variabilidad en la capacidad aromatizante de las distintas placentas; y aún dentro de cada placenta vemos que varía esta capacidad según los sustratos empleados.

Pero lo que se deduce claramente de la observación de la figura 64 (pág. 182), es que en casi todos los casos los valores correspondientes a este grupo de placentas con insuficiencia, quedan por debajo de los valores inferiores obtenidos para el conjunto de placentas normales estudiadas.

Sólo hay un caso, que se estudiará detenidamente más adelante, que tiene unos valores normales para todos los sustratos, exceptuando el dehidro-epiandrosterona-sulfato, que casi no aromatiza.

4.2.7 Relación entre la actividad aromatizante y la actividad sulfatásica en los casos de insuficiencia placentaria

Las enzimas aromatizantes de la placenta transforman algunos esteroides elaborados por el feto, en estrógenos (116).

La presencia de los estrógenos y su progresivo incremento a lo largo del embarazo, se puede considerar como un dato válido en relación con la funcionalidad metabólica del feto y de la placenta (118).

Los principales precursores fetales de los estrógenos son el dehidro-epiandrosterona-sulfato y el 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona-sulfato. Se cree que estos precursores son hidrolizados por la placenta antes de su aromatización.

En 1969 France y Liggins (119) estudiaron la placenta de una mujer que durante el embarazo había eliminado muy pequeñas cantidades de estrógenos. Estudios "in vitro" de esta placenta revelaban que el tejido no poseía actividad sulfatásica. El niño era aparentemente normal.

Los autores atribuían esta baja excrección de estrógenos durante el embarazo a la deficiencia sulfatásica de la placenta.

En 1970 Cedar (120) y Menini y col (121) describieron otros dos casos muy significativos de placentas con

deficiencias sulfatásicas.

4.2.7.1 Material utilizado

Con el fin de indagar la causa, o quizá las causas, de los casos de baja excrección de estrógenos durante el embarazo, se llevó a cabo el estudio de la actividad sulfatásica y aromatizante de un grupo de 12 de estas pacientes

Las placentas fueron recogidas y elaboradas inmediatamente después del parto y mantenidas siempre a una temperatura de 4°C.

Los métodos utilizados han sido descritos anteriormente: preparación de laplacenta (Esquema D, pág. 112) determinación de la actividad sulfatásica (3.8), análisis de los esteroides (3.7).

La determinación de los estrógenos totales se llevó a cabo por el método de Brown y col. (107) como está descrito en 3.7.1 .

El pregnandiol urinario ha sido determinado por cromatografía gas-líquido como diacetato después de purificación en columna de alúmina, como puede verse en 3.3.2.1

Los 17-cetoesteroides se determinaron como recomienda la Medical Research Council Committee on Clinical Endocrinology .

El dehidro-epiandrosterona-sulfato y el 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona-sulfato urinarios, se determi-

naron por cromatografía gas-líquido como derivados trimetil sililéteres de los esteroides libres obtenidos por solvolisis. (3.9.4)

El mismo procedimiento se utilizó para la determinación de dehidro-epiandrosterona-sulfato y 16α -hidroxidehidroepiandrosterona-sulfato plasmáticos.

4.2.7.2 Valores obtenidos

La figura 65 muestra la actividad sulfatásica de un grupo de 12 placentas procedentes de embarazos normales.

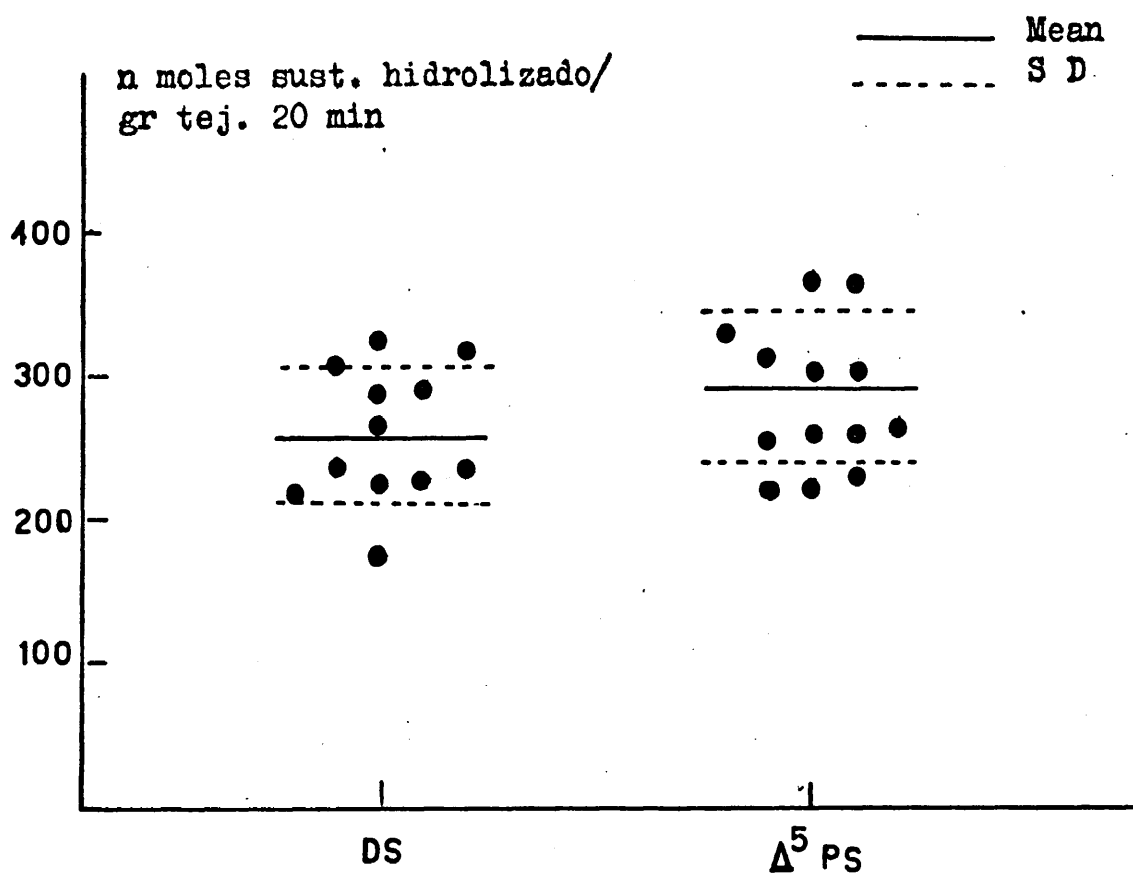


Fig. 65

Abreviaturas pág. XI

Los sustratos usados son dehidroepiandrosterona-sulfato y pregnandirol-sulfato. La actividad sulfatásica viene expresada en nano-moles de sustrato hidrolizado por gramo de tejido placentario fresco y por 20 minutos, resultando:

2533 \pm 46 para el DHA.S y 291 \pm 53 para el ⁵-P.S

En la figura 66 podemos ver la actividad de las enzimas aromatizantes en un grupo de placentas normales.

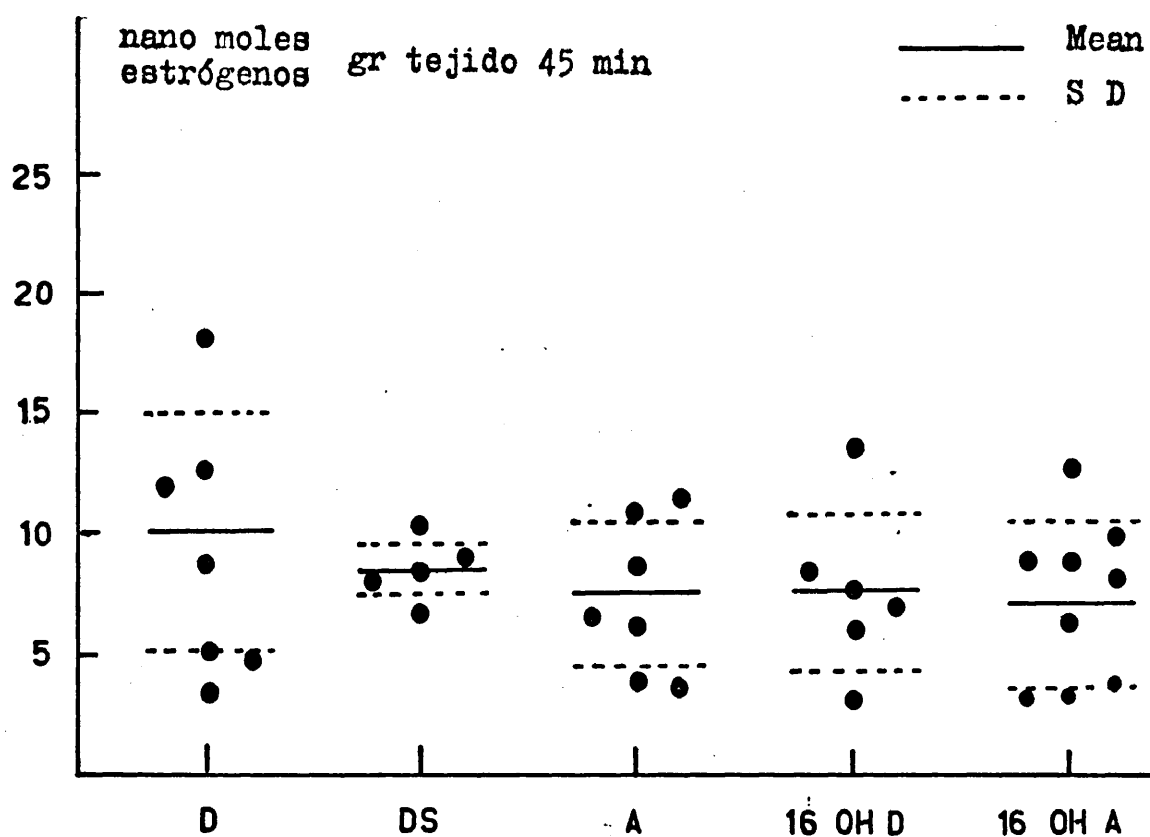


Fig 66

Abreviaturas pág. XI

Los sustratos usados en este caso, han sido:

Dehidro-epiandrosterona

Dehidro-epiandrosterona-sulfato

Androstendiona

16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona

16 α -hidroxi-androstendiona

La actividad aromatizante se ha expresado en nanomoles de estrógenos formados por gr de tejido placentario fresco en 45 minutos.

Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

dehidro-epiandrosterona	10,1 \pm 5,05
dehidro-epiandrosterona-sulfato	8,52 \pm 1,15
androstendiona	7,4 \pm 3,05
16 α -OH-dehidroepiandrosterona	7,6 \pm 3,24
16 α -OH-androstendiona	6,9 \pm 3,50

La Tabla XXIX muestra en conjunto los datos obtenidos del estudio de la actividad sulfatásica y aromatizante de 13 pacientes que presentaban una baja concentración de los estrógenos totales urinarios.

Solamente una (pac. 14) presenta valores normales para la actividad sulfatásica y aromatizante. En este caso la excrección urinaria del estriol resultó casi normal 12,9 mg/24 h.

Las demás pacientes muestran valores más bien bajos, tanto para la actividad sulfatásica como para la acti-

TABLA XXIX ACTIVIDAD SULFATASICA Y AROMATIZANTE EN PACIENTES CON BAJA EXCRECION DE ESTROGENOS

Pac.nº	Estrógenos en orina (mg/24 h)	Peso del niño (gr)	Actividad sulfatásica (n-moles /gr tej.)		Aromatización (n-moles/gr tej.)				
			D	Δ^5 PS	D	DS	A	16D	
Ficha clínica									
14	12.9	2.140	350	388	5.6	5.2	5.6	10.4	11.2
15	9.7	3.150	178	190	3.0	1.7	2.6	1.4	1.7
17	8.8	2.470	183	212	3.5	3.0	3.2	0.6	0.9
18	3.1	2.920	202	176	0	0	0	-	0
19a	5.4	2.650	-	-	5.3	0	9.5	4.5	6.6
19b	7.5(E ₃)	2.700	0	0	4.1	0.4	3.9	2.4	3.1
20	5.1	2.600	108	101	0.2	0.2	0.2	-	0
21	5.8	2.640	132	106	1.4	1.3	1.2	0.7	0.9
22	5.2	4.530	76	103	0.8	0.8	0.9	0.3	0.5
23	8.8	2.100	31	-	1.4	1.3	2.3	0.9	0.9
24	6.3	3.500	10	10	0.7	0.6	0.7	0.6	0.8
25	4.1	1.850	22	-	0.9	0.9	0.2	1.1	0.6
26	1.8(E ₃)	2.600	42	65	1.3	1.3	1.6	0.7	0.3
M±SD 13,1-30,8			(257+46)	(291+53)	(10,1+5,0)	(8.5+1.2)	(7.4+3.0)	(7.6+3.2)	(6.9+3.5)

Abreviaturas pág. XI

vidad aromatizante.

Encontramos, sin embargo, alguna excepción. Por ejemplo la paciente 19, estudiada en dos embarazos sucesivos, y la paciente 18. De hecho esta última presenta una actividad sulfatásica normal, mientras que tiene una deficiencia de actividad aromatizante; la paciente 19, por el contrario, presenta una actividad aromatizante normal y una deficiencia en la actividad sulfatásica.

La Tabla XXX (pág. 191) muestra la concentración de algunos esteroides presentes en el plasma de la paciente 19 durante el segundo embarazo.

Es interesante resaltar que mientras el estriol y el pregnandiol urinarios presentan valores de concentración inferiores a los normales, la concentración de dehidro-epiandrosterona-sulfato y de 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona-sulfato urinarios y plasmáticos, están sin embargo, por encima de los normales.

TABLA XXX ESTEROIDES EN LA PACIENTE 19b

S.e.	Orina (mg/24 h)			Pool orina (mg/1l)		Plasma (μ g/100 ml)	
	E ₃	P	17-KS	DS	16DS	DS	16DS
28	2,4	2,9	5,1			276,0	83,0
29	2,0	3,2	3,6			342,0	69,0
30	4,1	7,8	4,4				
31	2,5	5,1	4,1			348,0	110,0
32	3,5	11,1	3,6			182,0	78,0
33	5,0	11,4	4,0				
34	3,4	7,8	3,8			244,0	141,0
35	6,8	14,0	5,5				
36	6,6	12,8	3,7				
37	7,5	11,3	-				
38	4,6	9,8	-				
36-40				2,90	4,10		

S.e.= semanas de embarazo

Abreviaturas pág. XI

4.2.8 Interpretación de resultados

Los resultados de este estudio demuestran que pueden darse tres tipos distintos de deficiencias enzimáticas unidas a una baja excrección de los estrógenos urinarios:

1. Una deficiencia específica de las sulfatasas. (Paciente 19, primero y segundo embarazo)
2. Una deficiencia específica del complejo enzimático aromatizante. (Paciente 14)
3. Una deficiencia de los dos complejos enzimáticos que parece ser la más difundida. (Nueve de los trece casos estudiados).

De hecho, la elevada concentración del dehidroepiandrosterona-sulfato y del 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona-sulfato en la orina y en el plasma materno, se puede explicar sólo admitiendo una deficiencia de sulfatasas que no permitiría la ulterior aromatización de estos precursores de los estrógenos.

También los valores bajos del pregnandiol urinario se pueden explicar sólo si se admite una deficiencia de

las sulfatasas, y por lo tanto, la imposibilidad de hidrolizar el pregnandiol-sulfato, probable precursor de la pregnolona sulfato.

4.2.9 Aromatización en caso de placentas patológicas

Para esta experiencia se tomaron seis placentas, consideradas patológicas, porque, tres de ellas dieron lugar a fetos anancefálicos; dos, provenían de pacientes que habían acusado durante el embarazo una toxemia grave; y la sexta había padecido anemia hipocrómica.

4.2.9.1 Material utilizado

La preparación del tejido placentario fue igual que en los casos anteriores (Esquema D, pág. 112). Se utilizó la fracción 10.000 x g, y los sustratos incubados (según el Esquema E, pág. 116), fueron los siguientes:

Dehidro-epiandrosterona

19-hidroxi-dehidroepiandrosterona

Dehidro-epiandrosterona-sulfato

Androstendiona

19-hidroxi-androstendiona

Testosterona

19-hidroxi-testosterona

16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona

16 α -hidroxi-androstendiona

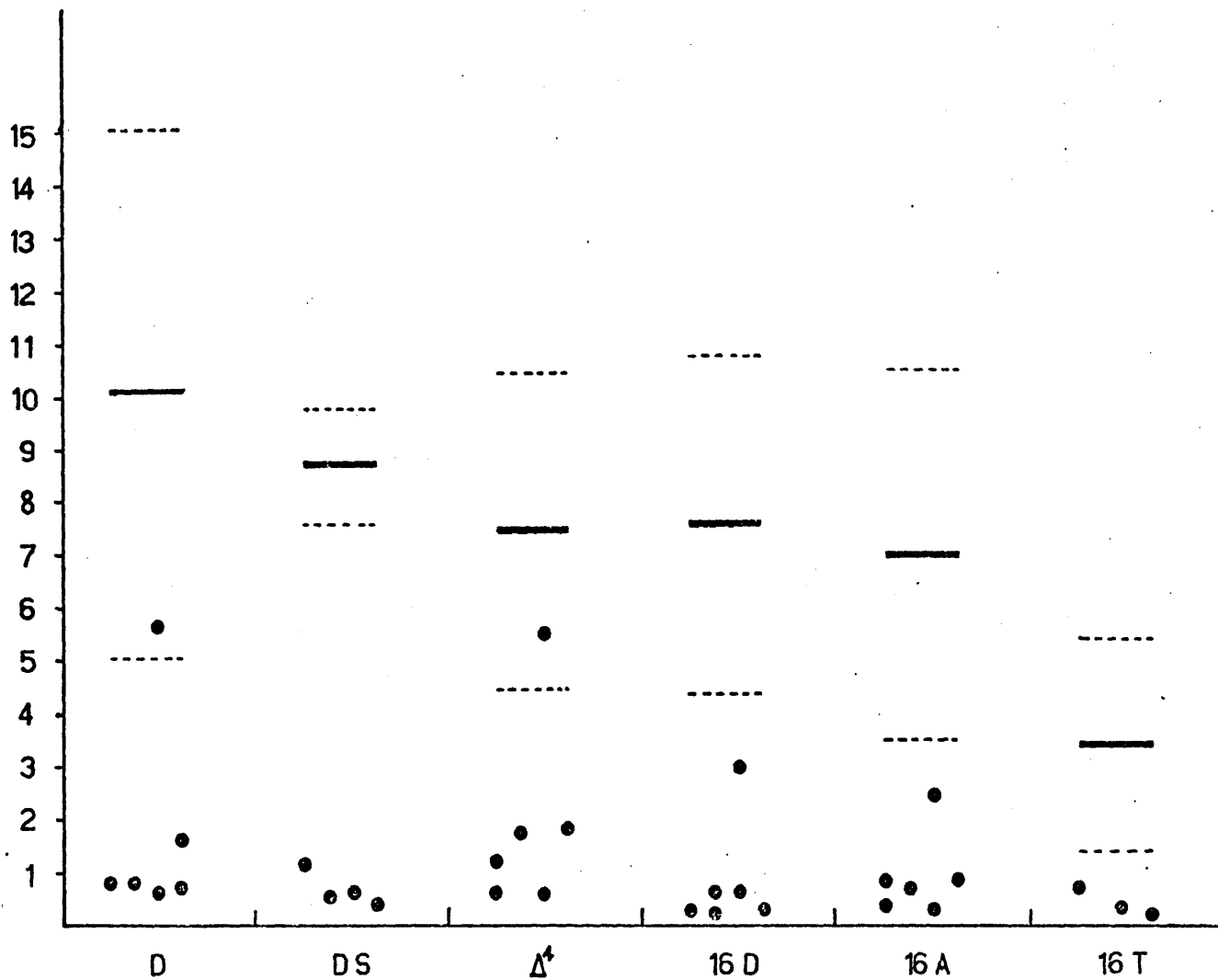
16 α -hidroxi-testosterona

La determinación de los estrógenos formados, se hizo como se explica en 3.7.1 y puede verse resumido en el

Esquema F (pág. 122)

4.2.9.2 Valores obtenidos

La Tabla XXXI muestra los resultados obtenidos



en estas incubaciones. La figura 67 representa gráficamente los resultados.

— Media
 - - - - - Desviación standard

● placentas normales

Abreviaturas pág. XI

TABLA XXXI AROMATIZACION EN CASOS DE PLACENTAS PATOLOGICAS

Pac.nº	D	19D	DS	A	19A	T	19T	16D	16A	16T
27	0,80			0,66				0,21	0,39	
28	0,86	0,91	1,01	1,78	3,18	1,71	2,48	0,69	0,69	0,72
				<u>Toxemia</u>						
				<u>Fetos anacefálicos</u>						
29	5,64			5,56				3,07	2,41	
30	1,64		0,52	1,82		1,68		0,33	0,81	0,30
31	0,77		0,66	1,22				0,66	0,84	
				<u>Anemia hipocrómica</u>						
32	0,66	0,70	0,49	0,59	0,98	0,87		0,24	0,24	0,24

Todos los datos están expresados en nanomoles de estrógenos formados /gr de tej. en 45 min. de incubación.

Abreviaturas pág. xi

4.2.10 Interpretación de los resultados

Dada la dificultad de obtener un número suficientemente significativo de placentas con estos tipos de patología en un periodo de tiempo determinado, es difícil dar una interpretación definitiva a los resultados.

Por ello, nos tenemos que limitar en este caso, a la aportación de los datos obtenidos con la esperanza de que estudios posteriores continúen proporcionando más experiencias, de modo que, acumulándose mayor número de datos, puedan darnos una luz sobre el problema.

Existen ya algunos datos de estudios precedentes (119, 121), pero con frecuencia surge la dificultad de que estos experimentos, realizados en distintos laboratorios, con distintos criterios, y bajo condiciones diversas, son difícilmente parangonables, por lo que la interpretación conjunta ofrece dificultad.

En nuestro caso, como puede verse en la Tabla XXXI (pág. 196) y en la figura 67 (pág. 195) la mayoría de los valores obtenidos -sólo cabe exceptuar una de las placentas de feto anancefálico- están por debajo de los límites inferiores de los valores medios obtenidos para el gru-

po de placentas normales.

Los valores correspondientes a las placentas de fetos anancefálicos -excluyendo a la que tiene valores que entran dentro de los márgenes normales de variabilidad-, es tán un poco por encima de los correspondientes a las placentas de pacientes con toxemia y anemia hipocrómica, que tienen valores aromatizantes muy bajos.

CONCLUSIONES FINALES

En este estudio se han investigado algunos aspectos relativos a la biosíntesis de los estrógenos y en particular del estriol, en placentas normales y patológicas. También se ha profundizado en el estudio de la reacción de aromatización en la placenta.

En primer lugar se estudiaron las condiciones óptimas para la reacción de aromatización en la placenta, respecto a la cantidad de sustrato (dehidroepiandrosterona y 16α -OH-dehidroepiandrosterona), y al tiempo de incubación.

En segundo lugar, se estudió la cinética de la reacción de aromatización de la 16α -OH-dehidroepiandrosterona, en relación con la formación de estriol y de algunos compuestos intermedios.

Se ha investigado también, la actividad aromatizante de un grupo de catorce placentas procedentes de pacientes con baja eliminación de estriol durante la gestación (insuficiencias placentarias), en relación con la actividad aromatizante de un grupo de trece placentas provenientes de embarazos normales.

Entre las placentas patológicas se han estudiado, en grupo aparte, seis placentas procedentes de tres gesta-

ciones con feto anancefálico, dos de toxemias graves y una de anemia hipocrómica.

Paralelamente a la actividad aromatizante se ha determinado también, en las gestaciones con insuficiencia placentaria, la actividad sulfatásica.

Se ha realizado, además, un estudio sobre los métodos de análisis cualitativo y cuantitativo de los esteroides 16α -hidroxilados, implicados en la biosíntesis del estriol en la placenta. Los métodos considerados han sido: cromatografía en columna de alúmina y ácido silícico, cromatografía sobre capa fina y cromatografía gas-líquido.

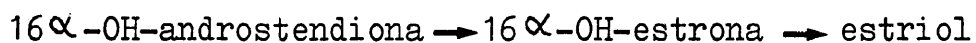
Los resultados más salientes de esta investigación pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. La cantidad de sustrato (dehidroepiandrosterona, 16α -OH-dehidroepiandrosterona) óptima para la reacción de aromatización es de 50-100 $\mu\text{g}/10$ g de tejido placentario.

2. La máxima producción de estrógenos a partir de incubaciones con dehidroepiandrosterona y 16α -OH-dehidroepiandrosterona, se obtiene entre los 40 y 60 minutos de incubación.

3. En el estudio cinético de la aromatización de la 16α -OH-dehidroepiandrosterona, se ha podido establecer que la secuencia principal de los productos que se for-

man sucesivamente es:



4. En el mismo estudio cinético se ha puesto en evidencia un compuesto, probable precursor del estriol, que según los criterios de caracterización empleados, parece ser la $16\alpha,19$ -dihidroxiandrost-4-ene-3,17-diona, que aparece entre los 20-30 minutos de incubación.

5. Este compuesto, probable precursor del estriol, se convierte en estriol mediante incubación con tejido placentario.

6. Se ha encontrado que la capacidad de aromatización de un grupo de catorce placentas procedentes de embarazos con insuficiencia placentaria, es significativamente inferior a la capacidad de aromatización de un grupo de trece placentas procedentes de embarazos normales.

7. Se ha comprobado también, que la actividad sulfatásica de las placentas procedentes de gestaciones con insuficiencia placentaria, es significativamente inferior a la del grupo de placentas procedentes de gestaciones normales.

8. Entre las pacientes con insuficiencia placentaria, ha podido demostrarse que una de ellas (paciente 19) tenía una placenta con deficiencia casi total de actividad

sulfatásica.

9. Es interesante resaltar que la concentración de dehidroepiandrosterona-sulfato y 16α -OH-dehidroepiandrosterona-sulfato en la sangre y orina de esta paciente estaban por encima de los valores normales.

10. Entre las pacientes con insuficiencia placentaria, se ha podido demostrar que una de ellas (paciente 18) tenía una placenta con una deficiencia casi total de actividad aromatizante.

11. En un grupo de seis placentas procedentes de tres gestaciones con feto anancefálico, dos de toxemias graves y una de anemia hipocrómica, se ha podido constatar que la capacidad aromatizante estaba por debajo de los valores normales en todos los casos excepto uno: se trataba de una placenta procedente de paciente con feto anancefálico que alcanzaba valores muy próximos a los normales.

12. Se ha estudiado el comportamiento cromatográfico en columnas de alúmina y ácido silícico de los esteroides 16α -hidroxilados, implicados en la biosíntesis de estríol en la placenta, utilizando tres sistemas de eluyentes distintos para la columna de alúmina y otro, para la columna de ácido silícico.

13. Se ha estudiado también, el comportamiento

cromatográfico de estos seis compuestos sobre capa fina, utilizando quince sistemas distintos de disolventes de desarrollo.

14. Se ha estudiado, además, el comportamiento en gas-cromatografía de estos mismos compuestos como derivados acetilados o trimetilsililéteres, en seis fases estacionarias diferentes.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía por orden de referencia

- (1) MOSSMANN, H.W.: Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures, Contrib. to Embryol. 26, 129 (1937).
- (2) PAGE, E.W.: Transfer of materials across the human placenta, Amer. J. Obstet. Gynec. 74, 705 (1957).
- (3) SEEDS, A., BATTAGLIA, F.C., HELLEGERS, A.E.: Effects of pregnancy on the pH PCO_2 and bicarbonate concentrations of peripheral venous blood. Am. J. Obstet. Gynec. 88, 1086 (1964).
- (4) BARTELS, H., METCALFE, J.: Some aspects of the comparative physiology of placental gas exchange. Proc. Int. Union Phys. Sci. 4, 34 (1965).
- (5) ADAMSONS, C.: Transport of organic substances and oxygen across the placenta. Birth Defects Original Article series, 1, 27. The National Foundation, March of Dimes. (1965).
- (6) MILLER, R.A.: Observations on gastric acidity during first month of life. Arch. Dis. Childh. 16, 22-30 (1941).
- (7) FUCHS, F.: Studies on the Passage of Phosphate between

mother and Foetus in the Guinea, Pig. Ejnar Munksgaard, Copenhagen (1957).

- (8) FUCHS, F., FUCHS, A.R.: Studies on the placental transfer of phosphate in the guinea pig. III. Phosphorus compounds in the placenta and their uptake of radioactive phosphate. Acta physiol. Scandinav. 39, 277 (1957).
- (9) D'AGOSTINO BARBARO, A.: Il ruolo della placenta nei caprini. 1. Contenuto di calcio del sangue materno, della placenta e del sangue fetale. Riv. Met. Vet. Zootechn., 4, 19-34. (1952).
- (10) HALLMANN, N. and SALMI, I.: On plasma calcium in the newborn. Acta Paediat., 42, 126-129. (1953).
- (11) WIDMER, W.: Beitrag zur fötalen Eisenversorgung. Schweiz. Med. Wschr. 78, 439-444 (1948).
- (12) CLEMETSON, C.A.B., CHURCHMAN, J.: The placental transfer of amino acids in normal and toxæmic. pregnancy. J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw. 61, 364 (1954).
- (13) SETNIKAR, I.: Trasporto di sostanze azotate dalla madre al feto. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 33, 1936 (1957).
- (14) VILLEE, C.A.: The placenta and fetal membranes. Williams and Wilkins, Baltimore (1960).

- (15) DANCIS, J.: The placenta in fetal nutrition and excretion. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 84, 1749-1755 (1962).
- (16) SCHREINER, W., VILLEE, C.A.: Oxidative phosphorylation in mitochondria from human placenta. *Am. J. Obst. Gynec.* 91, 961 (1965).
- (17) FLEXNER, L.B., POHL, H.A.: The transfer of radioactive sodium across the placenta of the white rat. *J. Cell. Comp. Physiol.* 18, 49-59 (1941a).
- The transfer of radioactive sodium across the placenta of the rabbit. *Amer. J. Physiol.* 134, 344-349 (1941b).
- (18) PLENTL, A.A.: The dynamics of the amniotic fluids. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 75, 746-761 (1959).
- (19) STERNBERG, J.: Placental transfer: Modern methods of study. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 84, 1731-1748 (1962).
- (20) HUTCHINSON, P.L., GRAY, M.J., PLENTL, A.A., ALVAREZ, H. CALDEYRO-BARCIA, R., KAPLAN, B., LIND, J.: The role of the fetus in the water exchange of the amniotic fluid of normal and hydramniotic patients. *J. Clin. Invest.* 38, 971-980 (1959).
- (21) SCOGGIN, W.A., HERBERT, G.M., ANSLOW, W.P., Jr., VAN'T RIET, B., McGAUGHEY, H.S., Jr.: Fetomaternal exchange of water at term. *Amer. J. Obstet. Gynec.*

90, 7-16 (1964).

- (22) HUGGETT, A. St. G.: Transactions of the First Conference on Gestation. Josiah Macy, Jr. Foundation, p. 53 (1954).
- (23) HERS, H.G.: Le metabolisme du fructose, Arscia, Bruxelles, pag. 123, 143 (1957).
- (24) ROUX, J.F., HAGERMAN, D.D., VILLEE, C.A.: Studies of the mechanism of fructose production by human placenta. J. Physiol. 146, 98 (1959).
- (25) RITTER, P., LEUTHARDT, F.: Formation of fructose and sorbitol from glucose in the human placenta. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 21, 212 (1963).
- (26) BRITTON, H.G., HUGGETT, A.St.G., NIXON, D.A.: Carbohydrate metabolism in the sheep placenta. Biochim. Biophys. Acta 136, 426 (1967).
- (27) DICZFALUSY, E.: Endocrinology of the foetus. Acta Obst. Gynec. Scand. 41 Suppl. 1, 45 (1962).
- (28) DICZFALUSY, E.: Endocrine functions of the human fetoplacental unit. Fed. Proc. 23, 791 (1964).
- (29) DICZFALUSY, E.: Biogenesis y metabolismo de los estrógenos en la mitad del embarazo. Acta Gynec. Madrid, 16, 429 (1965).
- (30) VILLEE, M.D., DOROTHY, B.: Development of endocrine function in the human placenta and fetus II. (Endocrine function in placenta and fetus -Villée)

Medical Progress vol. 281, nº 10, pág. 533 (1969)

- (31) ITO, Y., HIGASHI, K.: Studies on the prolactin-like substance in human placenta. II Endocr. Japon. 8, 279 (1961).
- (32) JOSIMOVICH, J.B., MacLAREN, J.A.: Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone. Endocrinology 71, 209 (1962).
- (33) GRUMBACH, M.M., KAPLAN, S.L., SCIARRA, J.J., BURR, L.M.: Chorionic growth hormone-prolactin: secretion, disposition, biologic activity in man, and postulated function as "growth hormone" of second half of pregnancy. Ann. New York Acad. Sc. 148, 501-531 (1968).
- (34) HALBAN, J.: Die innere sekretion von ovarium und placenta und ihre Bedeutung für die funktion der Milchdrüse. Arch. Gynäk. 75, 353 (1905).
- (35) DICZFALUSY, E.: Chorionic gonadotrophin and oestrogens in the human placenta. Acta endocr, (Kbh) 12, suppl. 12 (1953).
- (36) MEYER, A.S.: Conversion of 19-hydroxy- Δ^4 -androstene-3, 17-dione to oestrone by endocrine tissues. Biochim. Biophys. Acta 17, 441 (1955).
- (37) BAGGETT, B., ENGEL, L.L., BALDERAS, L., LANMAN, G., SAVARD, K., DORFMAN, R.I.: Conversion of ^{14}C -testosterone to ^{14}C -estrogenic steroids by endocri-

- ne tissues. *Endocrinology*, 64, 600 (1959).
- (38) SEEGAR, G.E., DELFS, E. : Pregnanediol excretion following bilateral oophorectomy in early pregnancy. *J.A.M.A.* 115, 1.267 (1940).
- (39) DICZFALUSY, E., BORREL, U.: Influence of oophorectomy on steroid excretion in early pregnancy. *J. Endocrinol. Metab.* 21, 1.119-1.126 (1961).
- (40) CASSMER, O.: Hormone production of isolated human placenta: studies on role of foetus in endocrine functions of placenta. *Acta endocrinol.* 32, Suppl. 45, 1-42 (1959).
- (41) LEUSDEN Van, H., VILLEE, C.A.: The de novo synthesis of sterols and steroids from acetate by preparations of human term placenta. *"Steroids"* 6,31 (1965).
- (42) ZELEWSKI, L., VILLEE, C.A.: Biosynthesis of squalene, lanosterol, and cholesterol by minced human placenta. *Biochemistry* 5, 1.805-1.814 (1966).
- (43) LEVITZ, M., EMERMAN, S., DANCIS, J.: Sterol synthesis in perfused human placenta. *Excerpta Medica Internat. Congress Series* 51, 266 (1962).
- (44) SOLOMON, S., LENZ, A.L., VANDE WIELE, R., LIEBERMAN, S.: Pregnenolone, an intermediate in the biosynthesis of progesterone and the adrenal cortical hormones. Abstracts, 126 th Meeting of the Am. Chem. Soc. New York, N.Y. p.29C (1954).

- (45) SOLOMON, S.: Synthesis of steroids by the placenta,
In: The placenta and fetal membranes, p. 201 Ed.:
C.A. Villee. Williams and Wilkins Co., Baltimore
Md. (1960).
- (46) MORRISON, G., MEIGS, R.A., RYAN, K.J.: Biosynthesis of
progesterone by the human placenta. Steroids (Sh.
Mass.), 6 Suppl. 1,59 (1965).
- (47) JAFFE, R. B., ERIKSSON, G., DICZFALUSY, E.: In situ per-
fusion of the midterm human placenta with choles-
terol. Abstracts, VI Pan Am. Congress of Endocr.
Mexico, D.F. 1965, p. E182. Ed. A. Stuart Mason
and A. Moragas Redecilla. I.C.S. 99. Excerpta Me-
dica, Amsterdam.
- (48) JAFFE, R. B., PETERSON, E. P.: In vivo steroid biogene-
sis and metabolism in the human term placenta.
2. In situ placental perfusion with cholesteryl-
7-³H. Steroids (Sh. Mass.) 8, 695 (1966).
- (49) RYAN, K. J., MEIGS, R., PETRO, Z.: The formation of
progesterone by the human placenta. Amer. J. Obs-
tet. Gynec. 96, 676 (1966).
- (50) MAEYAMA, M., TUCHIDA, Y., MATUOKA, H.: Progesterone me-
tabolism in twins: progesterone biosynthesis in
placenta in vitro. Steroids (Sh., Mass.) 11, 799
(1968).
- (51) HELLIG, H., LEFEBVRE, Y., GATTEREAU, D., BOLTE: Pla-
cental progesterone synthesis in the human. Abs-

- tracts, International Symposium on Foeto-placental Unit, Milan, 1968, p.8. Ed. Pecile and G.B. Carruthers ICS 170 Excerpta Medica, Amsterdam.
- (52) FRENCH, A.P., WARREN, J.C.: Sulfatase activity in the human placenta. *Steroids* (Sh. Mass.) 8, 79 (1966).
- (53) SOBREVILLA, L., HAGERMAN, D., VILLEE, C.: Metabolism of pregnenolone and 17- α -hydroxyprogesterone by homogenates of human term placentas. *Biochim. et Biophys. Acta* 93, 665-667 (1964).
- (54) PALMER, R., BLAIR, J.A., ERIKSON, G., DICZFALUSY, E.: Studies on metabolism of C₂₁ steroids in human foetoplacental unit, 3. Metabolism of progesterone and 20- α - and 20- β -dihydroprogesterone by midterm placentas perfused in situ. *Acta Endocrinol.* 53, 407-419 (1966).
- (55) KITCHIN, J.D., PION, R.J., CONRAD, S.H.: Metabolism of progesterone by term human placenta perfused in situ. *Steroids* 9, 263-274 (1967).
- (56) JAFFE, R.B., LEDGER, W.J.: In vivo steroid biogenesis and metabolism in human term placenta. *Steroids* 8, 61-78 (1966).
- (57) JUNGSMANN, R.A., SCHWEPPE, J.S.: Biosynthesis and metabolism of neutral steroids by human midterm placenta and fetal liver. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 27, 1151-1160 (1967).
- (58) SLAUNWHITE, W.R., KARSAY, M.A., HOLIMER, A., SANDBERG,

- A.A., NISWANDER, K.: Fetal liver as endocrine tissue. Steroids (Supp.2), 211-221 (1965).
- (59) BIRD, C.E., SOLOMON, S., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: Formation of C_{21} steroid sulphates and glucosiduronates by previable human foetuses perfused with 4- ^{14}C -progesterone. Biochim. Biophys. Acta 104, 623 (1965).
- (60) BIRD, C.E., WILSON, R., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E., SOLOMON, S.: Progesterone metabolism by the perfused previable human fetus. Excerpta Medica Intern. Congress Series 99, Abstract 408, p. E. 184 (1965).
- (61) SOLOMON, S., BIRD, C.E., WILSON, R., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: Progesterone metabolism in the fetal-placental unit. Excerpta Medica Intern. Congress Series 83, 721 (1964).
- (62) SOLOMON, S., LANMAN, J.T., LIND, J., LIEBERMAN, S.: The biosynthesis of Δ^4 -Androstendione and 17- α -hydroxy-progesterone from progesterone by surviving human fetal adrenals. J. Biol. Chem. 233, 1084 (1958).
- (63) ZANDER, J.: Relationship between progesterone production in the human placenta and the foetus. Ciba Foundation Study Group 9, 32 Churchill Ltd., London (1961).
- (64) ZANDER, J.: Progesterone and its metabolites in the placental-foetal unit. Excerpta Medica Intern. Con-

gress Series 83, 715 (1964).

- (65) PALMER, R., BLAIR, J.A., ERIKSON, G., WIKVIST, N., DICZFALUSY, E.: Studies on metabolism of C-21 steroids in human foetoplacental unit. 3. Metabolism of progesterone and 20- α -and 20- β -dihydroprogesterone by midterm placentas perfused in situ. Acta endocrinol. 53, 407-419 (1966).
- (66) FRANDSEN, V.A., STAKEMAN, G.: The site of production of oestrogenic hormones in human pregnancy. Hormone excretion in pregnancy with anencephalic foetus. Acta endocrinol. (Kbh) 38, 383 (1961).
- (67) RYAN, K.J., SMITH, O.W.: Biogenesis of strogens by human ovary. 1. Conversion of Acetate-1- 14 C to estrone and estradiol. J. Biol. Chem. 236, 705 (1961).
- (68) RYAN, K.J., SMITH, O.W.: Biogenesis of strogens by human ovary. 3. Conversion of cholesterol-4- 14 C to estrone. J. Biol. Chem. 236, 2204 (1961).
- (69) RYAN, K.J.: The conversion of pregnenolone-7- 3 H and progesterone-4- 14 C to oestradiol by a corpus luteum of pregnancy. Acta endocrinol. (Kbh) 44, 81 (1963).
- (70) JAFFE, R., PION, R., ERIKSON, G., WIKVIST, N., DICZFALUSY, E.: Studies on the aromatization of neutral steroids in pregnant women. 4. Lack of oestrogen formation from progesterone. Acta endocrinol. (Kbh) 413 (1965).
- (71) PION, R., JAFFE, R., ERIKSON, G., WIKVIST, N., DICZFALUSY, E.: Studies on the aromatization of neutral steroids in pregnant women. 5. Lack of oestrogen formation from progesterone. Acta endocrinol. (Kbh) 413 (1965).

- LUSY, E.: Studies on the metabolism of C-21 steroids in the human foeto-placental unit. I. Formation of α, β -unsaturated β -ketones in midterm placentas perfused in situ with pregnenolone and 17α -hydroxypregnenolone. Acta endocr., 48, 234 (1965).
- (72) DAVIS, M.E., PLOTZ, E.J.: Hormones in human reproduction. Part. II. Further investigation on steroid metabolism in human pregnancy. Am. J. Obst. Gynec., 76, 939 (1958).
- (73) SIITERI, P.K., MAC DONALD, P.C.: The utilization of circulating dehydroisoandrosterone sulfate for estrogen synthesis during human pregnancy. "Steroids", 2, 713 (1963).
- (74) DICZFALUSY, E., TROEN, P.: Endocrine functions of the human placenta. "Vitamins and Hormones", 19, 229 (1961).
- (75) FUCHS, F.: Endocrine factors in the maintenance of pregnancy. Acta Obstet. Gynec. Scand. 41, Suppl. 1 (1962).
- (76) GUAL, C., MORATO, T., HAYANO, M., GUT, M., DORFMAN, R. J.: Biosynthesis of estrogens. Endocrinology 71, 920 (1962).
- (77) KNUPPEN, R., BREUER, H.; Biogenese von Ostratetraenol beim Menschen. Acta Endocr. (Kbh.) 41, 129 (1963).

- (78) LONGCHAMPT, J.E., GUAL, C., EHRENSTEIN, M., DORFMAN, R. I.: 19-hydroxy- Δ^4 -androstene-3, 17-dione an intermediate in estrogen biosynthesis. *Endocrinology*, 66, 416 (1960).
- (79) MORATO, T., LEMUS, A.E., GUAL, C.: Efficiency of dehydrosteronesulphate as an estrogen precursor. "Steroids" Suppl. 1. 59 (1965).
- (80) RYAN, K.J.: Conversion of Δ^5 -androstene-3 β , 16 α , 17 β -triol to estriol by human placenta. *Endocrinology*, 63, 392 (1958).
- (81) RYAN, K.J. Metabolism of C-16 oxygenated steroids by human placenta. The formation of estriol. *J. Biol. Chem.*, 234, 2.006 (1959).
- (82) RYAN, K.J.: Biological aromatisation of steroids. *J. Biol. Chem.*, 234, 268 (1959).
- (83) BAULIEU, B., E.E.. DRAY, F.: Conversion of ^3H -dehydroisoandrosterone (3 β -hydroxy- Δ^5 -androsten-17-one) sulphate to ^3H -estrogens in normal pregnant women. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 23, 1.298 (1963).
- (84) BOLTE, E., MANCUSO, S., ERIKSON, G., WIKVIST, N., DICZFALUSY, E.: Studies on the aromatisation of neutral steroids in pregnant women. 3. Over-all aromatization of dehydroepiandrosterone sulphate circulating in the foetal and maternal compartments. *Acta endocr.*, (Kbh.) 45, 576 (1964).

- (85) WARREN, J.C., TIMBERLAKE, C.E.: Biosynthesis of estrogens in pregnancy: Precursor role of plasma dehydroisoandrosterone. *Obst. Gynec.* 23, 689 (1964).
- (86) MANCUSO, S., MANCUSO, F.P., TILLINGER, K.G., DICZFALUSY, E.: Lack of aromatisation of circulating dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in amenorrhoeic women stimulated with human gonadotrophins. *Acta Endocr. (Kbh)* 49, 248 (1965).
- (87) DELL'ACQUA, S., MANCUSO, S., ERIKSSON, G., RUSE, J.L., SOLOMON, S., DICZFALUSY, E.: Studies on the aromatization of neutral steroids in pregnant women 6. Aromatization on 16α -hydroxylated C-19 steroid by midterm placentas perfused in situ. *Acta Endocr.* 55, 401 (1967 b).
- (88) BOLTE, E., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: Metabolism of dehydroepiandrosterone- 4^{14}C (DHA) and dehydroepiandrosterone sulphate- 7α - ^3H (DHAS) by previable human fetuses. *Excerpta Medica Internat. Congress Series* 99, Abstract 407, p.E. 184 (1965).
- (89) SCHWERS, J., ERIKSSON, G., DICZFALUSY, E.: Metabolism of oestrone and oestradiol in the human foeto-placental unit at mid-pregnancy. *Acta Endocr. (Kbh)* 49, 65 (1965).
- (90) SCHWERS, J., GOVAERTS-VIDETSKY, M., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: Metabolism of oestrone sulphate by the previable human foetus. *Acta Endocr. (Kbh)* 50,

597 (1965).

- (91) FISHMAN, J., BROWN, J.B., HELLMAN, L., ZUMOFF, B., GALLAGHER, T.F.: Estrogen metabolism in normal and pregnant women. I. Biol. Chem. 237, 1.489 (1962).
- (92) GURPIDE, E., ANGERS, M., VANDE WIELE, R.L., LIEBERMAN, S.: Determination of secretory rates of estrogens in pregnant and non-pregnant women from the specific activities of urinary metabolites. I. Clin. Endocr. Metab. 22, 935 (1962).
- (93) DAVIS, B.D., Intermediates in Amino Acid Biosynthesis, Advances in Enzymol. 16, 247-312 (1955).
- (94) SPRINSON, D.B., Biosynthesis of Aromatic Compounds from D-Glucose, Advances in Carbohydrate Chem., 15, 235-270 (1970).
- (95) HEARD, R.D.H., JACOBS, R., O'DONNELL, V., PERON, F., SAFFRAN, J.C., SOLOMON, S., THOMPSON, L.M., WILLOGHBY, H., YATES, C.H.; The application of C¹⁴ to the study of the metabolism of the sterols and steroid hormones, Recent Prog. Horm. Research 9, 383 (1954).
- (96) BAGGETT, B., ENGEL, L.L., SAVARD, K., DORFMAN, R.I.: The conversion of testosterone-3-C¹⁴ to C¹⁴-estradiol-17 β by human ovarian tissue. J. Biol. Chem 221, 931 (1956).

- (97) BARTON, D.H.R., DE MAYO, P. Triterpenoids. Part XV:
The constitution of Icterogenin, a Physiologically Active Triterpenoid. J. Chem.Soc. 887 (1954).
- (98) WILCÓX, R.D., ENGEL, L.L.: Kinetic studies on the role of 19-hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione in estrogen biosynthesis. Steroids, Suppl. 1, 49 (1964).
- (99) BRODIE, H.J., POSSANZA, G., TOWNSLEY, J.D.: Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis. V. Stereochemical comparison of aromatization in placental and microbiological systems. Biochim. Biophys. Acta 152, 770 (1968).
- (100) AKHTAR, M., SKINNER, S.J.M.: The intermediary role of a 19-Oxoandrogen in the biosynthesis of oestrogen. Biochem. J. 109, 318 (1968).
- (101) TOWNSLEY, J.D., BRODIE, H.J.: A new placental metabolite of oestr-4-ene-3,17-dione. A possible source of error in oestrogen estimation. Biochem. I. 101 25 c (1966).
- (102) MENINI, E.: Il meccanismo dell'aromatizzazione biologica degli steroidi. Seminari biologici della Facoltà di Medicina e chirurgia 1969-70. Vita e Pensiero 290-304 (1971).
- (103) BREUER, H., GRILL, P.: Formation of formaldehyde in the aromatization of neutral steroids to phenolic steroids. Zeitschr.f. Physiol. Chem. 324, 254 (1961).

- (104) AXELROD, L.R., MATTHIJSEN, C., RAO, P.N., GOLDZIEHER J. W.: The fate of carbon-19 in the course of estrogen biosynthesis from testosterone-19-¹⁴C. *Acta endocr.* 48, 383 (1965).
- (105) SCHNEIDER, W.C., HOGEBOOM, G.H.: Intracellular Distribution of Enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. *Chem.* 183, 123 (1950).
- (106) KAPLAN, N.O., COLOWICK, S.P., NEUFELD, E.F.: Pyridine nucleotide transhydrogenase: Direct evidence for and mechanism of the transhydrogenase reaction. *J. Biol. chem.* 195, 107 (1952).
- (107) BROWN, J.B., MAC LEOD, S.C., MAGNANGHTAN, C., SMITH, M. A., SMITH, B.J.: A rapid method for estimating oestrogens in urine using a semi-automatic extractor. *J. Endocr.* 42, 5 (1968).
- (108) KOBER, S.: Eine kolorimetrische Bestimmung des Bruns-thormons. *Biochem. Z.* 239, 209 (1931).
- (109) BROWN, J.B.: A chemical method for the determination of oestriol, oestrone and oestradiol in human urine. *Biochem. J.* 60, 185 (1955).
- (110) ALLEN, W.M.: A simple method for analysing complicated absorption curves of use in the colorimetric determination of urinary steroids. *J. Clin. Endocr. Metab* 10.71 (1950).
- (111) WARREN, J.C., FRENCH, A.P.: Distribution of steroid

- sulfatase in human tissues. J.Clin. Endocr. Metab. 25, 278 (1965).
- (112) MENINI, E., BOMPIANI, A.: Determinazione colorimetrica degli estrogeni in gravidanza con l'AutoAnalyzer. Automazione nella chimica analitica. Proc., Technicon International Symposium, 37-39 Roma (1969).
- (113) BURNSTEIN, S., LIBERMANN, S.: Hydrolysis of Ketosteroid hydrogen sulfates by solvolysis procedures. J. Biol. Chem. 233, 331 (1958).
- (114) MENINI, E., ENGEL, L.L.: Kinetic study of the aromatization of testosterone and androstendiones by human placental microsomes. Abs VI Acta endocrinologica Cong. Helsinki. Suppl. 119, 76 (1967).
- (115) FAHMY, D., GRIFFITHS, K., TURNBULL, A.C.: Metabolism of 19-hydroxy-C₁₉-steroids by human corpus luteum. J. Endocr. 44, 133 (1969).
- (116) DICZFALUSY, E.: Steroid metabolism in the foeto-placental unit, in The foeto-placental unit. A. Pecile, C. Finzi. Excerpta medica foundation, 65, (1969).
- (117) MENINI, E., ORR, J.C., GIBB, R.C., ENGEL, L.L.: Chromatographie in phase gazeuse des steroïdes hormonaux, R. SCHOLLER, JAYLE, M.F. Ed. Dunod. Editeur, Paris, 41 (1968).

- (118) KLOPPER, A.: The assessment of Placental function in clinical practice, in "Fetus and placenta". A. KLOPPER and DICZFALUSY, Ed. Blackwell, Oxford (1969).
- (119) FRANCE H., LIGGITS, T.: J. Clin. endocr. metab. 29, 138 (1969).
- (120) CEDARD, L.: Estrogen and progesterone biosynthesis in human full-term placenta perfused in vitro. In "Fetal evaluation during pregnancy and labor P.G. Crosignani and G. Pardi, Ed., Academic Press, New York, 11 (1971).
- (121) MENINI, E., VEGA RAMOS, P., FERREIROS, H.P., BOMPIANI, A.: Enzymatic activity of placentae from normal and complicated pregnancies in relation to the biosynthesis of estrogens in "Fetal evaluation during pregnancy and labor". P.G. Crosignani and G. Pardi, Ed. Academic Press. New York, 19 (1971).

Indice alfabético de autores *

- ADAMSONS, C.: 5
- AKHTAR, M, SKINNER, S.J.M.: 100
- ALLEN, W.M.: 110
- AXELROD, L.R., MATTHIJSSSEN, C., RAO, P.N., GOLDZIEHER, J.
W.: 104
- BAGGETT, B., ENGEL, L.L., SAVARD, K., DORFMAN, R.I.: 96
- BAGGETT, B., ENGEL, L.L., BALDERAS, L. LANMAN, G., SAVARD,
K., DORFMAN, R.I.: 37
- BARTON, D.H.R., DE MAYO, P.: 97
- BAULIEU, B., E.E., DRAY, F.: 83
- BIRD, C.E., SOLOMON, S., WIQVIST, E., DICZFALUSY, E.: 59
- BIRD, C.E., WILSON, R., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E., SOLO-
MON, S.: 60
- BOLTE, E., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: 88
- BOLTE, E., MANCUSO, S., ERIKSON, G., WIQVIST, N., DICZFA-
LUSY, E.: 84
- BREUER, H., GRILL, P.: 103
- BRITTON, H.G., HUGGETT, A. St. G., NIXON, D.A.: 26
- BRODIE, H.J., POSSANZA, G., TOWNSLEY, J.D.: 99

* Los números corresponden a los de la Bibliografía por orden de referencia

- BROWN, J.B.: 109
- BROWN, J.B., MAC LEOD, S.C., MAGNANGHTAN, C., SMITH, M.A.,
SMITH, B.J.: 107
- BURNSTEIN, S., LIBERMANN, S.: 113
- CASSMER, O.: 40
- CEDARD, L.: 120
- CLEMETSON, C.A.B., CHURCHMAN, J.: 12
- D'AGOSTINO BARBARO, A.: 9
- DANCIS, J.: 15
- DAVIS, B.D.: 93
- DAVIS, M.E., PLOTZ, E.J.: 72
- DELL'ACQUA, S., MANCUSO, S., ERIKSSON, G., RUSE, J.L., SO-
LOMON, S., DICZFALUSY, E.: 87
- DICZFALUSY, E.: 27, 28, 29, 35, 116
- DICZFALUSY, E., BORREL, U.: 39
- DICZFALUSY, E., TROEN, P.: 74
- FISHMAN, J., BROWN, J.B., HELLMAN, L., ZUMOFF, B., GALLA-
GHER, T.F.: 91
- FLEXNER, L.B., POHL, H.A.: 17
- FRANCE, H., LIGGITS, T.: 119
- FRANDSEN, V.A., STAKEMAN, G.: 66
- FRENCH, A.P., WARREN, J.C.: 52
- FUCHS, F.: 7, 75
- FUCHS, F., FUCHS, A.R.: 8
- GRUMBACH, M.M., KAPLAN, S.L., SCIARRA, J.J., BURR, L.M.: 33
- GUAL, C., MORATO, T., HAYANO, M., GUT, M., DORFMAN, R.J.:
76
- GURPIDE, E., ANGERS, M., VANDE WIELE, R.L., LIEBERMAN, S.:
92

- HALBAN, J.: 34
- HALLMANN, N., SALMI, I.: 10
- HEARD, R.D.H., JACOBS, R., O'DONNELL, V., PERON, F., SAF-
FRAN, J.C., SOLOMON, S., THOMPSON, L.M., WILLO-
GHBY, H., YATES, C.H.: 95
- HELLIG, ., LEFEBVRE, Y., GATTEREAU, D., BOLTE: 51
- HERS, H.G.: 23
- HUGGETT, A. St.G.: 22
- HUTCHINSON, P.L., GRAY, M.J., PLENTL, A.A., ALVAREZ, H.,
CALDEYRO-BARCIA, R., KAPLAN, B., LIND, J.: 20
- ITO, Y, HIGASHI, K.: 31
- JAFFE, R.B., ERIKSSON, G., DICZFALUSY, E.: 47
- JAFFE, R.B., LEDGER, W.J.: 56
- JAFFE, R.B., PETERSON, E.P.: 48
- JAFFE, R.B., PION, R., ERIKSSON, G., WIKVIST, N., DICZFALU-
SY, E.: 70
- JOSIMOVICH, J.B., MADLAREN, J.A.: 32
- JUNGSMANN, R.A., SCHWEPPE, J.S.: 57
- KAPLAN, N.O., COLOWICK, S.P., NEUFELD, E.F.: 106
- KITCHIN, J.D., PION, R.J., CONRAD, S.H.: 55
- KLOPPER, A.: 118
- KNUPPEN, R., BREUER, H.: 77
- KOBER, S.: 108
- LEUSDEN Van, H., VILLEE, C.A.: 41
- LEVITZ, M., EMERMAN, S., DANCIS, J.: 43
- LONGCHAMPT, J.E., GUAL, C., EHRENSTEIN, M., DORFMAN, R.I.:
78
- MAEYAMA, M., TUCHIDA, Y., MATUOKA, H.: 50

MANCUSO, S., MANCUSO, F.P., TILLINGER, K.G., DICZFALUSY,
E.: 86

MENINI, E.: 102

MENINI, E., BOMPIANI, A.: 112

MENINI, E., ENGEL, L.L.: 114

MENINI, E., ORR, J.C., GIBB, R.C., ENGEL, L.L.: 117

MENINI, E., VEGA RAMOS, P., FERREIROS, H.P., BOMPIANI;A:121

METCALFE, J., BARTELS, H.: 4

MEYER, A.S.: 36

MILLER, R.A.: 6

MORATO, T., LEMUS, A.E., GUAL, C.: 79

MORRISON, G., MEIGS, R.A., RYAN, K.J.: 46

MOSSMANN, H.W.: 1

PAGE, E.W.: 2

PALMER, R., BLAIR, J.A., ERIKSON, G., DICZFALUSY, E.: 54

PALMER, R., BLAIR, J.A., ERIKSON, G., WIQVIST, N., DICZFALU-
SY, E.: 65

PION, R., JAFFE, R., ERIKSON, G., WIQVIST, N., DICZFALU-
SY, E.: 71

PLENTL, A.A.: 18

RITTER, P., LEUTHARDT, F.: 25

ROUX, J.F., HAGERMAN, D.D., VILLEE, C.A.: 24

RYAN, K.J.: 69, 80, 81, 82

RYAN, K.J., MEIGS, R., PETRO, Z.: 49

RYAN, K.J., SMITH, O.W.: 67, 68

SCHNEIDER, W.C., HOGEBOM, G.H.: 105

SCHREINER, W., VILLEE, C.A.: 16

SCHWERS, J., ERIKSSON, G., DICZFALUSY, E.: 89

- SCHWERS, J., GOVAERTS-VIDETSKY, M., WIQVIST, W., DICZFALU-
SY, E.: 90
- SCOGGIN, W.A., HARBERT, G.M., ANSLOW, W.P., Jr., VAN'T
RIET, B., McGAUGHEY, H.S.: 21
- SEEDS, A., BATTAGLIA, F.C., HELLEGERS, A.E.: 3
- SEEDAR, G.E., DELFS, E.: 38
- SETNIKAR, I.: 13
- SIITERI, P.K., MacDONALD, P.C.: 73
- SLAUNWHITE, W.R., KARSAY, M.A., HOLLMER, A., SANDBERG, A.A.,
NISWANDER, K.: 58
- SOBREVILLA, L., HAGERMAN, D., VILLEE, C.: 53
- SOLOMON, S.: 45
- SOLOMON, S., BIRD, C.E., WILSON, R., WIQVIST, N., DICZFALU
SY, E.: 61
- SOLOMON, S., LENZ, A.L., VANDE WIELE, R., LIEBERMAN, S.: 44
- SOLOMON, S., LANMAN, J.T., LIND, J., LIEBERMAN, S.: 62
- SPRINSON, D.B.: 94
- STERNBERG, J.: 19
- TOWSLEY, J.D., BRODIE, H.J.: 101
- TURNBULL, A.C., FAHMY, D., GRIFFITHS, K.: 115
- VILLEE, C.A.: 14
- VILLEE, M.D., DOROTHY, B.: 30
- WARREN, J.C., FRENCH, A.P.: 111
- WARREN, J.C., TIMBERLAKE, C.E.: 85
- WIDMER, W.: 11
- WILCOX, R.D., ENGEL, L.L.: 98
- ZANDER, J.: 63, 64
- ZELEWSKI, L., VILLEE, C.A.: 42